



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PŘÍPRAVA MYŠÍCH MONOKLONÁLNÍCH
PROTILÁTEK PROTI CYKLIN-DEPENDENTNÍ KINÁZE
13**

PREPARATION OF MOUSE MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CYCLIN-DEPENDENT
KINASE 13

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Marek Šupák

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1319/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Marek Šupák**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Příprava myších monoklonálních protilátek proti cyklin–dependentní kináze 13

Zadání diplomové práce:

Cílem diplomové práce je příprava a následné testování myších monoklonálních protilátek proti cyklin–dependentní kináze 13 (Cdk13). V první fázi budou připraveny peptidy odpovídající různým částím Cdk13 proteinu, které následně budou použity k imunizaci myší. Pokud se u imunizovaných myší prokáže přítomnost protilátek schopných detekce peptidů Cdk13 použitých v imunizaci, budou z daných myší izolovány splénocyty, které budou fúzovány s myelomovou linií Sp 2/0. Následně budou získané hybridomy testovány na jejich využití v metodice imunoblotu, imunoprecipitace, imunofluorescence a chromatinové imunoprecipitace.

Termín odevzdání diplomové práce: 19.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Marek Šupák
student(ka)

Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom mojej diplomovej práce bola príprava monoklonálnej protilátky proti cyklin-dependentnej kináze 13 (CDK13). V teoretickej práci som sa zamerlal na väzbu antigén – protilátka, ktorá je podstatná práve pri využití monoklonálnych protilátok pri stanovení CDK13, ako aj transkripcii, ktorú táto kináza ovplyvňuje. Rovnako som sa venoval metódam Western blot a ELISA, na ktorých som založil detekciu novo vzniknutých protilátok. V teoretickej časti som následne zmienil aj protilátky a definíciu antigénu, na ktorú som nadviazal svoje výsledky v diskusii.

V praktickej časti som sa venoval príprave antigénu – jeho izolácii a purifikácii na peristaltickej pumpe. Ďalej som sa venoval imunizácii, jej priebehu a množstvu antigénu použitého na imunizáciu myši. Po imunizácii sa zameriavam na fúziu buniek sp-2 a splenocytov, ktoré bolo najskôr treba odobrať z imunizovanej myši a prečistiť. Po samotnej fúzii zmieňujem selekciu hybridomovna selekčnom média HAT a následne ich detekciu najskôr pomocou metódy ELISA a neskôr pomocou metódy Western blot.

Vzniknuté hybridomy s pozitívnou odozvou pri metóde ELISA boli zamrazené na ďalšie testovanie na Výskumnom ústave veterinárneho lekárstva v Brne, kde bola spravená celá praktická časť diplomovej práce. Tieto zamrazené hybridomy budú v ďalšom výskume testované imunoprecipitáciou, ktorou je táto diplomová práca zakončená.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

CDK13, hybridomová technológia, primárne protilátky, Western blot, ELISA

ABSTRACT

The aim of this master's thesis is to prepare a monoclonal antibody against cyclin-dependent kinase 13 (CDK13). The theoretical part focuses on antigen-antibody binding, which is essential for the use of monoclonal antibodies in the determination of CDK13 as well as the transcription that this kinase affects. This section is also devoted to Western blot and ELISA methods for detection of newly generated antibodies. Furthermore, the antibodies and the antigen definition are stated, which are later on discussed.

The practical part is devoted to the preparation of antigen - its isolation and purification on a peristaltic pump. It also addresses immunization, its course, and the amount of antigen used to immunize mice. After immunization, the work focuses on fusion of sp-2 cells and splenocytes, which were first removed from the immunized mouse and purified. After the fusion alone, selection of hybridomas on HAT selection medium is mentioned, followed by detection first by ELISA and later by Western blotting.

The resulting hybridomas with positive ELISA response are frozen for further testing at the Veterinary Research Institute in Brno, where the entire practical part of this thesis was carried out. These frozen hybridomas are further tested by immunoprecipitation to conclude this thesis.

KEY WORDS

CDK13, hybridoma technology, primary antibody, western blot, ELISA

Citácia tlačenej práce:

ŠUPÁK, Marek. *Příprava myších monoklonálních protilátek proti cyklin-dependentní kináze 13*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113497>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D..

Citácia elektronického zdroja:

ŠUPÁK, Marek. *Příprava myších monoklonálních protilátek proti cyklin-dependentní kináze 13* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113497>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D..

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje sú riadne uvedené v zozname použitých zdrojov s správne odcitované. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá na komerčné účely len s povolením vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Chcel by som poďakovať svojmu vedúcemu diplomovej práce Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D. za usmerňovanie a trpezlivosť pri práci na teoretickej i praktickej časti. Rovnako by som chcel poďakovať MVDr. Zore Smržovej za pomoc pri práci s hybridomami a Mgr. Adamovi Norkovi, Ph.D. za pomoc pri príprave antigénu. Ďalej by som sa chcel poďakovať celému Výskumnému ústavu veterinárneho lekárstva v.v.i. za šancu pracovať na diplomovej práci a na projektoch, ktoré sú mi veľkým prínosom do môjho kariérneho života. V neposlednom rade sa chcem poďakovať rodičom, starým rodičom, mojej sestre a priateľke i všetkým ostatným, ktorí ma neustále podporujú.

Obsah

CIEĽ PRÁCE	8
Teoretická časť	8
Experimentálna časť	8
ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
Transkripcia.....	10
Bunečný cyklus	10
CDK13 – cyklin-dependetná proteín-kináza 13	11
Protilátky – imunoglobulíny.....	12
Antigén.....	13
ELISA.....	14
Imunoblot	14
Prietoková cytometria	15
EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	16
Chemikálie	16
Chemikálie – Imunizácia.....	16
Chemikálie – ELISA	16
Chemikálie – Western blot.....	17
Chemikálie – Imunoprecipitácia	19
Príprava antigénu.....	19
Antigén.....	19
Rozmrazenie buniek.....	19
Kultivácia buniek	19
Získavanie antigénu z buniek – sonifikácia	19
Purifikácia antigénu.....	20
Imunizácia	22
Proces imunizácie.....	22
Časový harmonogram imunizácie	22
Kontrola imunizácie	22
Elektroforéza	23

Fúzia	24
Kultivácia myelomových buniek SP-2 buniek	24
Príprava feedru	24
Vlastná fúzia.....	24
Selekcia hybridomov	25
Kontrola produkcie protilátok	25
ELISA.....	25
WESTERN BLOT.....	26
Imunoprecipitácia.....	27
VÝSLEDKY	28
Produkcia a čistenie antigénu	28
Meranie obsahu proteínu vo frakciách	29
Zakoncentrovanie frakcií s najvyšším obsahom antigénu.....	30
Použité množstvo antigénu na imunizáciu	31
Kontrola imunizácie	32
Fúzia buniek	33
1.imunizácia - 14.3.2019 pre antigén C	33
2.imunizácia - 21.3.2019 pre antigén N	34
Optimalizácia metódy Western blot pre jednotlivé antigény C a N.....	35
Testovanie sér získaných z imunizovaných myší	36
Testovanie hybridomov	37
Imunoprecipitácia.....	40
DISKUSIA	41
ZÁVER.....	44
SKRATKY	45
TABUĽKY	47
ZDROJE	48

CIEĽ PRÁCE

Teoretická časť

Cieľom teoretickej časti diplomovej práce bolo prehľadne zhrnúť úvod do metód použitých v experimentálnej časti. Rovnako bola zhrnutá aj problematika cyklin-dependetných kináz a ich rola v živých organizmoch.

Experimentálna časť

Ciele experimentálnej časti boli nasledovné:

Imunizácia myší antigénmi C-terminálnej a N-terminálnej domény CDK13

Testovanie odobranej krvi na prítomnosť protilátok pomocou metódy ELISA

Kultivácia, selekcia a testovanie vyprodukovaných hybridomov pomocou metódy ELISA a Western blot

Imunoprecipitácia sér získaných z odobranej krvi z imunizovaných myší

ÚVOD

Delenie buniek je základným predpokladom života na Zemi. Tento proces sa postupne stáva jasnejší a jasnejší každým rokom. Mnoho vedcov nám ukázalo základné cesty – J.G. Mendel objavil dedičnosť, Watson a Crick nám ukázali ako dedičnosť vyzerá v praxi – molekulu DNA. Molekula DNA je schopná sa replikovať. A nielen to. Dokáže prepísať svoju informáciu do RNA (transkripcia) a následne do proteínov v procese, ktorý sa volá translácia.

Transkripcia je dej, ktorý je prísne regulovaný a každá chyba môže mať fatálne následky. Prepis do mRNA (mediátorová RNA) a následný prepis do tRNA (transférová RNA) je základom pre expresiu každého proteínu. A proteíny sú jedným zo základných kameňov života.

Proces bunecného delenia je veľmi zložitý a na mnohých úrovniach kontrolovaný proces. Vlastná regulácia prechodov jednotlivých fáz bunecného cyklu sa uskutočňuje vďaka funkcii špecifických enzýmov bunecného typu, ktoré sú potranslačne modifikované. Jednou z významných modifikácií je fosforylácia. Fosforyláciou a defosforyláciou dokáže bunka regulovať aktivitu proteínov potrebných pre jednotlivé kroky. Na túto schopnosť sú potrebné enzýmy špecifického charakteru – fosfotransferázy (proteín kinázy) a proteínfosfatázy. Aj keď proteín kinázy, rovnako ako proteínfosfatázy, sú prítomné v bunke počas celého cyklu, ich aktivácia alebo deaktivácia riadi prechody bunky medzi jednotlivými fázami G_1 , M, G_2 a S. Prechod jednotlivými fázami bunecného cyklu je možný pomocou aktivity cyklin-dependentných kináz (CDK). K tomu, aby boli aktívne, je potreba asociácia s ich väzbovými partnerom – cyklinom. Tieto cykliny dostali svoj názov podľa toho, že na rozdiel od proteínfosfatáz sa ich koncentrácia mení v priebehu bunecného cyklu [1]. Ich naviazanie je potrebné na aktiváciu proteínfosfatáz a preto tieto proteínfosfatázy se označujú ako závislé na cyklinoch, alebo inak povedaná dependentné. Je teda zrejmé, že ich aktivita musí byť veľmi presne kontrolovaná, aby došlo k aktivácii danej kinázy v správnom fáze bunecného cyklu. Medzi najrozšírenejšie spôsoby regulácie CDK kináz patrí práve fosforylácia.

Táto diplomová práca sa bude zameriavať na vytvorenie protilátky proti cyklin-dependentnej kináze 13 (CDK13). Jej väzbovým partnerom je cyklin K [2]. Táto kináza sa priamo nezúčastňuje na regulácii bunecného cyklu, ale podieľa sa na regulácii transkripcie závislej na RNA polymeráze II. Pretože jej schopnosť regulácie je dôležitá pre jednotlivé kroky transkripcie a tým i pre funkciu bunecného cyklu, je nutné vyvinúť reagencie vhodné pre jej detekciu. Vývojom protilátok sa otvoria nové možnosti pre vytvorenie komplexu proteín-proti látka v rozličných biochemických metódach akou je ELISA, Western blot alebo imunoprecipitácia. Na vytvorenie protilátok proti CDK13 sa používa laboratórna metóda imunizácie laboratórnych myší kmeňa Balb/C špecifickými epitopami – antigénmi schopnými vyvolať produkciu protilátok. Tieto protilátky môžu po izolácii slúžiť k pochopeniu CDK13, jej funkcií a aktivite v bunke.

TEORETICKÁ ČASŤ

Transkripcia

Transkripcia je prepis genetickej informácie z jedného typu nukleovej kyseliny do druhého typu. Najčastejším prípadom je prepis DNA (deoxyribonukleová kyselina) do RNA (ribonukleová kyselina). Niektoré gény si exprimované vo väčšej miere a niektoré v menšej miere. Taktiež vo veľkej miere závisí od daného orgánu. Hlavným enzýmom zúčastňujúcim sa transkripcie je RNA-polymeráza. Pomocou RNA-polymerázy II sa získa tkz. transkript, čo je prepísaná DNA do mediátorovej RNA (mRNA). Táto mRNA prichádza do ribozómu, kde sa zúčastňuje translácie, t.j. prepisu do aminokyselinovej sekvencie. Jednotlivé aminokyseliny sú prinášané transférovou RNA (tRNA), ktorá sa základe komplementarity bázy priradí jednotlivé antikodóny ku kodónom.

RNA polymeráza II je zodpovedná za transkripciu proteínov kódovaných v génoch eukaryotických buniek [10]. Samotný proces transkripcie je rozdelený do presných krokov ktoré sú iniciácia, elongácia a terminácia. V iniciácii sa viaže RNA-polymeráza na promotor – na presne určené miesto na reťazci DNA a zahajuje sa syntéza nového reťazca DNA. Pri elongácii sa RNA polymeráza posúva v smere 5' ku 3' koncu a syntetizuje novú molekulu RNA. V terminačnej fáze dochádza k zastaveniu tvorby RNA a vyviazaniu RNA polymerázy. Vzniknutá mRNA môže byť modifikovaná post-transkripčnými úpravami.

Ústredná dogma molekulárnej biológie:

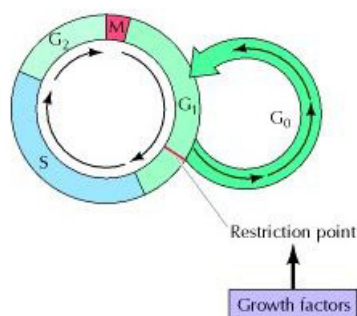
DNA (transkripcia) → RNA(translácia) → proteín

Bunečný cyklus

Bunečný cyklus sa skladá zo 4 presne definovaných úsekov: G₁-fáza, v ktorej sa bunka pripravuje na delenie a syntetizuje si všetky potrebné veci k deleniu ako sú proteíny, ribozómy a enzýmy, S-fáza, v ktorej sa replikuje DNA pre obe dcérske bunky, G₂-fáza v ktorej sa syntetizujú proteíny a bunka narastá do dvojnásobnej veľkosti, M-fáza, v ktorej sa ruší stena bunkového jadra, chromozómy sú ťahané na opačné pól bunky, vytvárajú sa okolo chromozómov nové cytoplazmatické membrány a bunka sa delí na dve časti[3].

Úspešný prechod bunečným cyklom je závislý na bezproblémovom priechode jednotlivými kontrolnými bodmi. Vo väčšine prípadov sa jedná o zastavenie bunečného cyklu v G₁-fázy, kedy bunka vyhodnotí, že jej veľkosť nie je optimálna pre delenie [1]. Delenie je teda závislé na tom, či sa bunka nachádza v optimálnom prostredí na jej dostatočný rast – t.j. extracelulárne podmienky sú kľúčovou podmienkou delenia. Ďalší kľúčový kontrolný bod delenia sa nachádza v G₂-fázy, teda vo fázy pred priamym delením [1]. Tieto kontrolné body sú podstatné aj z ďalšieho hľadiska. Umožňujú ostatným bunkám regulovať systém bunečného cyklu pomocou rôznych signálov – rastové faktory či extracelulárne signálne molekuly.

Medzi najkritickejšiu rolu bunky patrí rozhodnutie, či je vhodná doba sa deliť alebo nie [6]. V prípade zlého rozhodnutia môžu nastať problémy, ktoré bývajú katastrofické – napríklad tvorba nádorového ochorenia [3]. Takýto problém môže nastať aj pri S-fáze, kedy zle nasyntetizovaná molekula DNA môže viesť k nekontrolovateľnému deleniu. Tento bunecný cyklus je ovládaný množstvom rôznych enzýmov. Medzi dôležitú skupinu patria enzýmy proteínkinázy, fosforylujúce kľúčové proteíny, ktoré iniciujú alebo regulujú replikáciu DNA, mitózu a cytokinézu [1,6]. Tieto proteín-kinázy môžu byť následne aj inhibované rôznymi inhibítormi, ktoré tým ovplyvňujú bunecný cyklus [5,9].



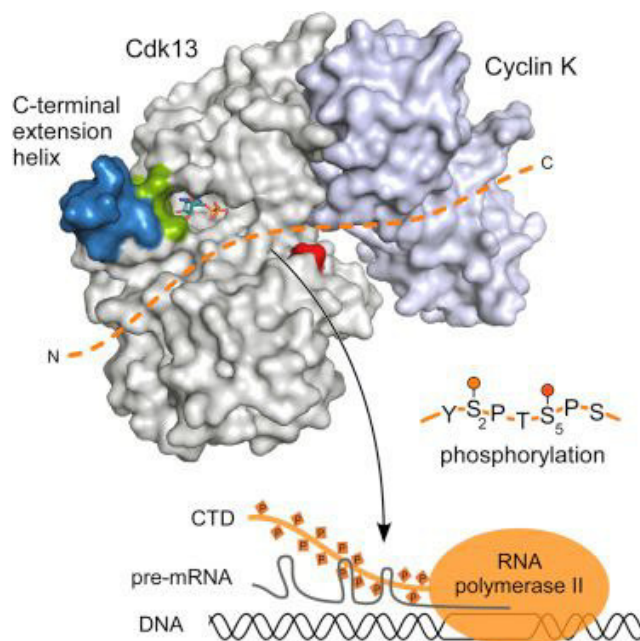
Obrázok 1: bunecný cyklus – restriction point – restričný bod, v tomto bode sa ukončuje bunecné delenie a bunka prechádza do kľudovej G₀-fáze [13]

Fosforylace a defosforylace základným mechanizmom ako môže bunka pôsobiť na aktivitu enzýmu [6]. Fosforylačné reakcie prevádzajú proteín-kinázy, zatiaľ čo defosforyláciu proteín-fosfatázy [1]. Proteín-kinázy sú prítomné v rovnakom množstve počas celého bunecného cyklu a ich množstvo sa pohybuje v stovkách [8]. Aktivita proteín-kináz stúpa a klesá cyklicky. Niektoré sú aktívne počas S-fázy a iné až počas delenia. Aktivitu týchto proteín-kináz riadia regulačné proteíny tzv. cykliny. Tieto proteíny nemajú žiadnu inú enzýmovú aktivitu. Práve proteín-kinázy, ktoré k svojej aktivite potrebujú aktivite potrebujú naviazanie cyklinu sa označujú ako cyklin-dependetné proteín-kinázy (Cdk)[3]. Narozdiel od proteín-kináz sa koncentrácia cyklinov mení cyklicky a tým ovplyvňujú bunecný cyklus. Úlohou cyklin-dependetných kináz je riadenie bunecného cyklu, zahŕňajúc vývoj neurónovej siete, transkripciu i posttranskripčné úpravy [2,12].

CDK13 – cyklin-dependetná proteín-kináza 13

CDK13 (alebo tiež iným názvom CDC2L5[11]) hrá jednu z kľúčových rolí regulácie génovej transkripcie [9]. Oproti klasickým CDK kinázám, je CDK13 možné rozdeliť do troch funkčných oblastí a to N- a C- terminálnej oblasti, ktoré sú obklopené kinázovou doménou, typickou pre celú rodinu CDK kináz. A práve v N- a C- terminálnych oblastiach (ramenách) sa nachádza celá rada proteínových motívov, akými sú oblasťami bohatými na arigin/serin, dve oblasti bohaté na prolin a alanín, a jednu na serin. Výskum ukázal, že môže hrať dôležitú úlohu vo fosforylácii Ser2 a Ser 5 C-terminálnej domény RNA polymerázy II. a transkripcií, predovšetkým v procese elongácie, i keď jej presná rola v procese zostáva neistá [2,10,12]. Veľkosť CDK13 u ľudí je až okolo 165 kDa, pričom jeho hlavná úloha je v rastových signálnych dráhach [12]. Jeho zdrojmi sú predovšetkým pohlavné orgány –

vaječníky a semenníky. Ďalšou zaujímavou vlastnosťou je jeho potenciónálna reštrikčná aktivita pri výrobe vírových proteínov HIV, pričom jeho potlačenie vedie k nárastu produkcie vírových jednotiek v bunke.

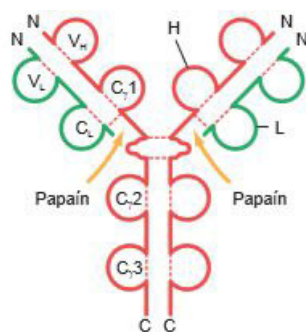


Obrázok 2:Štruktúra CDK13 a väzba na cyklin K [12]

Väzbovým partnerom CDK13 je cyklin K. Tento proteín sa zaraďuje do traskripčných cyklinových proteínov. Práve aktivácia proteínu CDK13 týmto cyklickým proteínom cyklin K umožňuje jeho aktiváciu a otvára rôzne nové možnosti použitia komplexu v bunkách.

Protilátky – imunoglobulíny

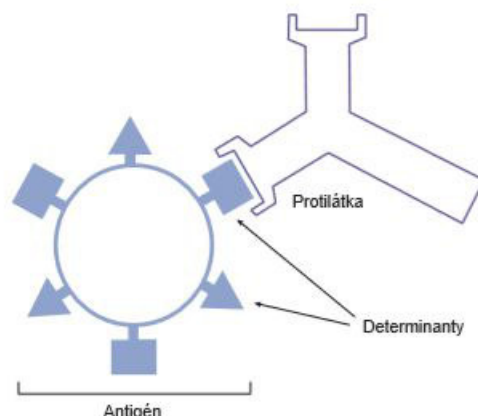
Základná molekula imunoglobulínu sa skladá zo štyroch polypeptidových reťazcov. Menší reťazec sa označuje ako ľahký (l – light), väčší ako ťažký (H – heavy)[10]. Jednotlivé reťazce sa na seba viažu pomocou disulfidických väzieb, obdobne tak aj 2 ťažké reťazce, čím vytvárajú štruktúru imunoglobulínu v tvare Y. Pôsobením preteolytických enzýmov na molekulu imunoglobulínu sa získajú charakteristické fragmenty[10].



Obrázok 3:Kostra imunoglobulínu a miesta pôsobenia papainu [10]

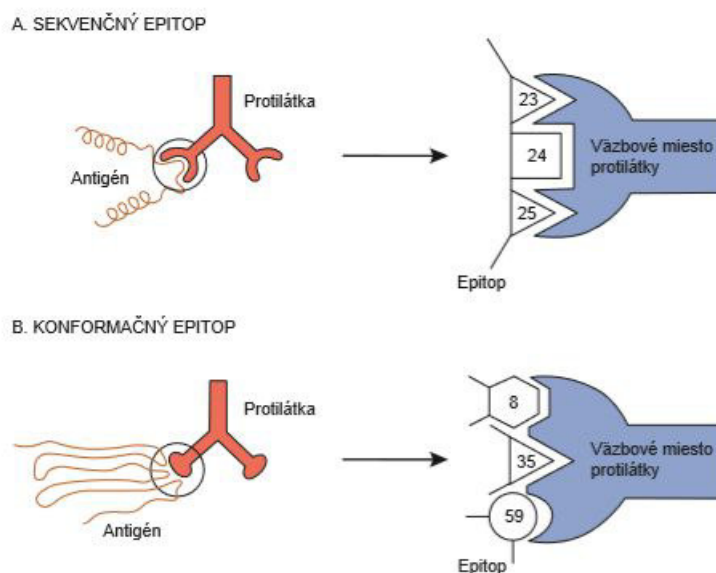
Antigén

Antigén je cudzia látka, schopná v tele indukovať imunitnú odpoveď [10]. Každý deň konzumujeme veľké množstvo proteínov, lipidov a sacharidov, pričom len malé množstvo z nich má potenciál stať sa potencionálne nebezpečným a indukovať imunitnú odpoveď. Imunitná odpoveď môže byť odlišná v rôznych osobách a rovnako to závisí aj od genetickej výbavy daného jedinca.



Obrázok 4: Vázba protilátky na antigén [10]

Cudzorodé antigény sa líšia schopnosťou vyvolávať imunitnú odpoveď, ktorá sa označuje ako imunogénnosť. Táto imunogénnosť je závislá na genetike prijímateľa, preto platí, že čím je antigén štruktúrne odlišnejší od jedinca prijímajúceho antigén, tým väčšia je jeho imunogénnosť.



Obrázok 5: Modely epitopov[10]

Imunitná odpoveď na cudzorodé častice je zmes viacerých čiastkových reakcií proti každej zložke. Každá molekula má úseky na ktoré je imunitná odpoveď namierená. Tieto časti sa volajú epitopy, alebo inak nazývané determinanty. Počet epitopov je rozdielny a vo všeobecnosti platí pravidlo – väčšia molekula má viac epitopov. Sekvenčný epitop je

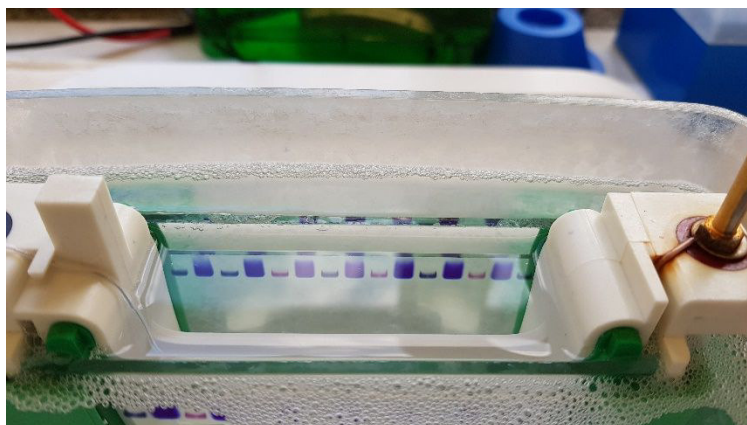
determinovaný primárnou štruktúrou proteínu. To znamená, že protilátka reaguje na daný proteín len v jeho denaturovanej forme. Naproti tomu je konformačný epitop. Ten získava väzbové miesto pre protilátku zložením do sekundárnej a terciálnej štruktúry, pričom sa vzdialené aminokyseliny priblížia k sebe a vytvoria charakteristický úsek. V tomto prípade sa viaže protilátka na proteín v natívnej forme.

ELISA

Je jednou z najpoužívanějších analytických biochemických metód používaná na detekciu a stanovenie koncentrácie antigénu a protilátok. Princíp tejto metódy je zmena chromogénneho substrátu na farebný produkt detekovateľný pri určitej vlnovej dĺžke. ELISA využíva dvoch základných vlastností imunoglobulínov. Po prvé je to schopnosť viazať sa na povrch plastov (napr. polystyrénu) a v druhom rade schopnosť viazať enzýmy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekúl. ELISA využíva na svoju detekciu veľa substrátov. Často používaný je ortho-fenyldiamin dihydrochlorid (OPD), ktorý je ale na ústupe kvôli potenciálnym karcinogénnym vlastnostiam. Ďalším často používaným substrátom je 3,3',5,5'-tetramethylbenzidín (TMB). Tento substrát je modrej farby a po pridaní kyseliny sírovej (0,1M), kyseliny chlorovodíkovej alebo kyseliny fosforečnej sa mení na žltý produkt. Intenzita zafarbenia je priamoúmerná množstvu naviazania na enzým. Medzi použitia metódy ELISA v chémii patrí napríklad kvantitatívne stanovenie imunoglobulínu G [20].

Imunoblot

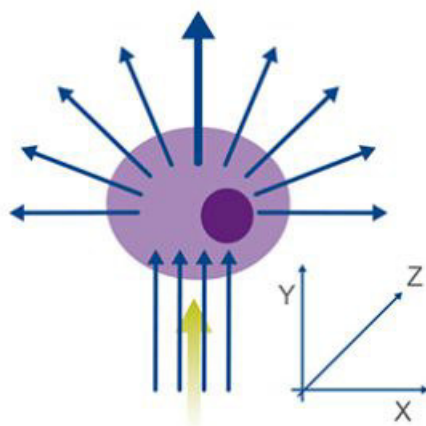
Protilátky sú bežne používané na detekciu alebo izoláciu proteínov z biologických vzoriek[13]. Na detekciu RNA sa používa Northern blot, na DNA Southern blot a Western blot na proteíny. Jeho najväčšou výhodou je rýchlo, jednoducho a jednoznačne určiť proteín i v zložitej zmesi proteínov. Táto výhoda je zabezpečená selektívnou interakciou primárna protilátka-proteín. Na začiatku sa oddelia jednotlivé proteíny elektroforézou v polyakrylamidovom géle [14]. V tomto prípade môžeme mať proteíny o rozdielnej molekulovej hmotnosti oddelené, ale proteíny s rovnakou molekulovou hmotnosťou nedokážeme oddeliť. Na prenos proteínu z PAGE-SDS gélu sa následne využíva blotovanie (prenos) pomocou elektrického prúdu na nitrocelulóзовú membránu. Metóda Western blot si schopnosťou presne stanoviť proteín našla uplatnenie v medicíne i analytickej a bunečnej biológii na detekciu ochorenia a proteínov a proteínových komplexov v bunke.



Obrázok 6: PAGE-SDS gél počas elektroforézy

Prietoková cytometria

Prietoková cytometria je analytická metóda slúžiaca na separáciu buniek z heterogénnej populácie. Bunky sa delia na základe spoločného znaku, ktorý je merateľný cytometrom. Medzi možné parametre môžeme zahrnúť relatívnu veľkosť častíc, relatívnu granularitu alebo relatívnu intenzitu fluorescence [15]. Svetlo sa na danej bunke rozptyľuje a senzory sledujú žiarenie prechádzajúce cez bunku, os y, a žiarenie odrážajúce sa od bunky do osi z. Tieto hodnoty korelujú s veľkosťou buniek a ich granulositou [19].



Obrázok 7: Rozptyľ svetla prechodom cez bunku [19]

Charakteristiky sú spracované optickým systémom merajúcim rozptyľ dopadajúceho žiarenia laserového žiarenia na bunky a emisiu fluorescence. Je možné sortovať bunky z rôzneho pôvodu (myš, králik) ako aj rôzne typy buniek (lymfocyty, červené krvinky) [20]. Vďaka svojej jednoduchosti a rýchlosti si našla prietoková cytometria miesto vo viacerých použitíach ako je meranie T- lymfocytov v hemofagocytovej lymfohistiocytóze [16], získavaní pôvodu PLA buniek [17] alebo skúmaní apoptózy buniek [18].

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Experimentálna časť je zložená z 5 častí. V 1. časti sú spomenuté jednotlivé chemikálie a návody pre vytvorenie roztokov použitých v ďalších častiach. Druhá časť je venovaná príprave antigénu z buniek *Escherichia coli* a jeho následnej purifikácii. Tretia časť sa zaoberá imunizáciou myší a nadväzuje na 4. časť, kde získané bunky boli sfúzované. V poslednej časti prebieha kontrola produkcie protilátok hybridomami pomocou 3 metód: ELISA, Western blot a imunoprecipitácia.

Chemikálie

Chemikálie – Imunizácia

Farbiaci roztok:

- Do odfarbovacieho roztoku o objeme 200 ml bolo pridaných 1 g farbiva amidočern.

Zloženie odfarbovacieho roztoku:

- 260 ml destilovanej vody
- 100 ml 96% etanolu
- 40 ml koncentrovanej kyseliny octovej

Roztok Tris-HCl:

- Tris-HCl 6,1 g (pre pH=6,8) alebo 18,5 g (pre pH=8,8) bolo rozpustené v 50 ml destilovanej vody.
- Kyselinou chlorovodíkovou bolo okyslené na požadované pH (6,8 alebo 8,8).
- Objem bol doplnený do 100 ml destilovanou vodou.

Chemikálie – ELISA

Krycí pufor

Najskôr boli pripravené roztoky uhličitanu sodného a disodného.

Roztok uhličitanu sodného:

- 2,2 g bezvodého uhličitanu sodného bolo rozpustené v 100 destilovanej vode

Roztok uhličitanu disodného:

- 1,68 g uhličitanu disodného bolo rozpustené v 100 destilovanej vode

Príprava pufru

- 10,4 ml roztoku uhličitanu sodného spolu s 3,1 ml roztoku uhličitanu disodného pridáme do kadičky a doplníme vodou do 100 ml

Blokačný pufor

- 0,05% roztok odtučneného mlieka v premývacom pufri

Premývací pufor

- 900 ml destilovanej vody
- 100 ml 10x PBS
- 0,5 ml TWEEN 20

Primárna protilátka

- získaná z imunizovaných myší – sérum – pozitívna kontrola
- supernatant získaný z hybridomov

Sekundárna protilátka

- HRP anti-mouse protilátka (GE Healthcare, NA931-1ML)

Chromogénny substrát

- TMB - 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, T8665-100ML)

Roztok zastavujúci reakciu

- 1 M HCl – 9 ml koncentrovanej HCl bolo doplnených do 100 ml destilovanou vodou

Chemikálie – Western blot

10x-zásobný roztok s SDS

- 144 g glycin
- 30 g Tris-HCl
- 10 g SDS
- doplníme do objemu 1 l

Elektrodový pufor

- 100 ml 10x-zásobného roztoku s SDS
- 900 ml destilovanej vody

Transférový pufor

- 100 ml 10xzásobného roztoku s SDS
- 200 ml methanolu
- 700 ml destilovanej vody

Premývací pufor

- 900 ml destilovanej vody
- 100 ml 10x PBS
- 0,5 ml TWEEN 20

Blokačný pufor

- 0,05% roztok odtučneného mlieka v premývacom pufri

Primárna protilátka

- získaná z imunizovaných myší – sérúm
- supernatant získaný z hybridomov

Sekundárna protilátka

- HRP anti-mouse protilátka (GE Healthcare, NA931-1ML)

Chromogénny substrát

Substrát bol namiešaný tesne pred použitím. Na jednu membránu bolo potrebných 1 ml roztoku.

Príprava 1ml substrátu:

- Do skúmavky bolo napipetovaných 500 ul luminolového roztoku (roztok A)
- K roztoku A bolo pridané rovnaké množstvo roztoku B.
- Výsledný roztok bol prepitovaný a do použitia uložený v tme.

Vývojka

- G150 – nariedená vo vode podľa návodu (1:5)

Ustalovač

- G354 - nariedená vo vode podľa návodu (1:3)



Obrázok 8: Aparatúra na western blot

Chemikálie – Imunoprecipitácia

Príprava NP40 pufru:

- Do kadičky s destilovanou vodou bolo pridaných 4,38 g NaCl (150mM), 0,37 g EDTA (2mM), 5 ml NP-40 (1%), 0,61 g Tris-HCl (10mM).
- Roztok bol okyslený 1M kyselinou chlorovodíkovou na pH=7,4 a doplnený vodou na objem 500 ml.

Lemli roztok:

Do kádinky bolo pridané 2,4 g SDS, 12 ml glycerolu, 19,2 ml Tris-HCl pH=6,8, 6 ml B-merkaptetoetanolu, 2,8 ml destilovanej vody. Zmes bola premiešaná a potom bolo pridané malé množstvo brómfenolovej modrej do požadovaného odtieňu. Zmes bola opäť premiešaná.

Príprava antigénu

Antigén

Antigén bol pripravovaný z buniek *Escherichia coli* geneticky upravené na produkciu daného proteínu. Bakteriálna kultúra bola uchovávaná pri teplote -60 °C s DMSO a kultivačným médiom.

Zloženie zmrazovacieho média:

- 700 ul kultivačného média
- 100 ul DMSO
- 200 ul suspenzie buniek

V prípade kontaminácie imidazolom je možnosť využiť dialýzu, ktorú sme v našom prípade nemuseli použiť. Médium, ktoré sme použili muselo byť bohaté na glukózu. To zamedzilo laktózový operón a umožnilo efektívnejšie spracovanie uhlíkatého substrátu.

Rozmrazenie buniek

Antigén bol šetrne rozmrazený pipetovaním kultivačného média do suspenzie buniek. Následne bol všetok obsah prenesený do kultivačného média o objeme 500 ml.

Kultivácia buniek

Bunky boli kultivované 12 hodín pri neustálom miešaní v trepačke pri teplote 24 °C v Erlenmayerovej banke o objeme 1 l.

Získavanie antigénu z buniek – sonifikácia

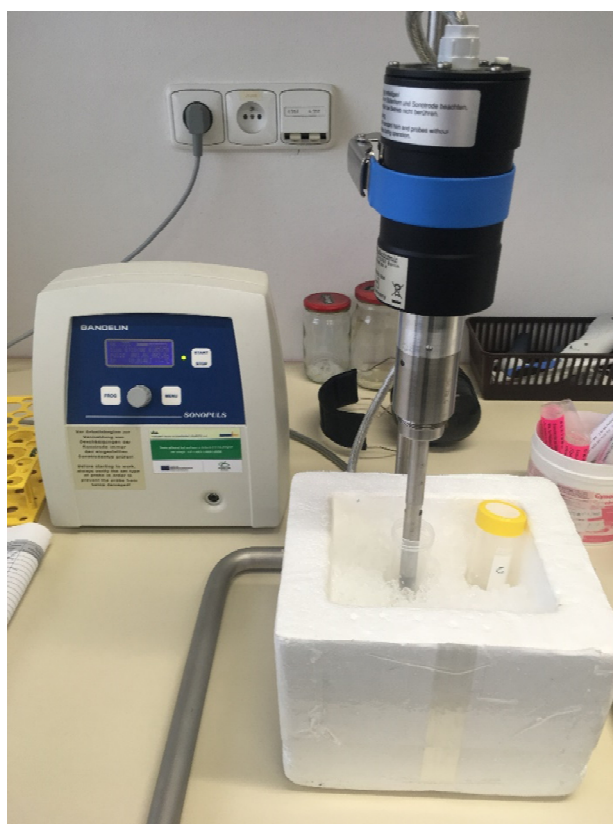
Zvyšky kultivačného média boli odstránené centrifugáciou. Využívali sme chladenú centrifúgu 5000 RPM na 10 minút, aby sa pri centrifugácii neporušil proteín, ktorý by mohol degradovať pri zvýšení teploty spôsobeným strihovými silami v kvapaline. Následne bol

supernatant zliati a k bunkám sme pridali 10 ml HA pufru. Opatrne sme bunky rozuspendovali a následne rozbili sonifikáciou. Na sonifikáciu sme použili sondu VS70T.

Podmienky centrifugácie:

- Amplitúda - 35%
- Čas - 10 minút
- Doba pulzu - 1 sekunda
- Prestávka - 2 sekundy

Cyklus bol opakovaný 3-krát, pričom posledný cyklus skrátili na polovicu (5 minút). Neustále sme zmes udržiavali na ľade kvôli inhibícii proteáz. Lokálne môže teplota siahať až do 80 °C, preto bolo vhodné zmes premiešať približne každú minútu. Opäť prebehla centrifugácia, kde sa odstránili prebytočné časti buniek.



Obrázok 9: Sonifikácia buniek

Purifikácia antigénu

Na začiatku bol proteín zahustený centrifugáciou cez membránové skúmavky z pórmí o veľikosti 30 kDa.

Antigén bol purifikovaný na kolone HisTrap o objeme 1 ml. Rozdielne kolony boli použité pre rozdielny typ antigénu (N-term a C-term).



Obrázok 10: Kolona na separáciu proteínu

Peristaltická pumpa

V prvom prípade sme použili peristaltickú pumpu Watson Marlow. Na začiatku sme si pumpu ekvilibrovali. Nastavili sme si vhodný prietok na 1ml za 1 minútu, ktorý je optimálne pre daný proteín. Pri tejto rýchlosti má proteín čas na naviazanie, pričom väčšia rýchlosť by mohla viesť k deštrukcii proteínu. Využili sme možnosť zapojenia kolón pre C-terminálnu doménu a N-terminálnu doménu sériovo, pričom sa značne skrátil čas purifikácie. Dbali sme na to, aby sa do kolóny nedostal vzduch. Bublínky vzduchu by bránili viazaniu proteínu pričom by mohli poškodiť kolónu.

Postup získavania proteínu z kolony:

- Uhličitanový pufoer s nízkym obsahom imidazolu
- Uhličitanový pufoer s vysokým obsahom imidazolu 100nM

Získané frakcie:

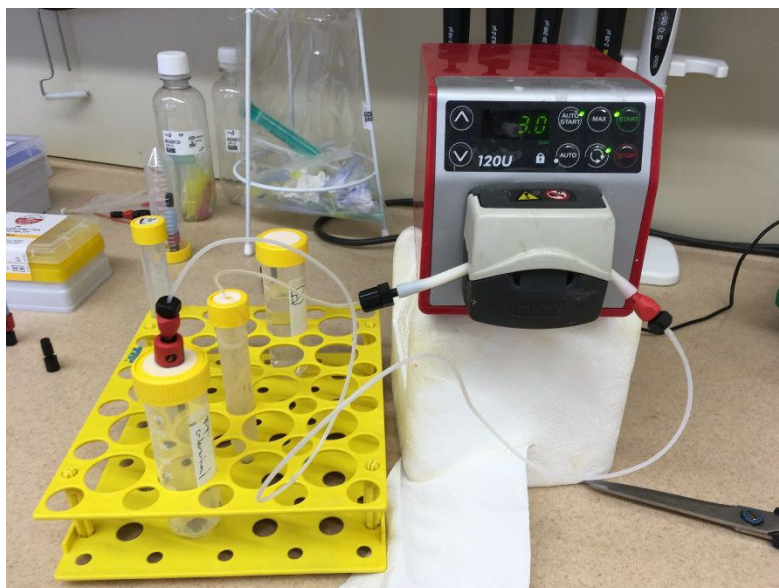
L – load – zmes proteínov pred vložením do kolony

FT – flow through - všetky nečistoty uviaznuté v kolone

W1 – wash – proteín vytesnený vyššou koncentráciou imidazolu – objem 10 ml

W2 – wash – 2. frakcia s nižšou koncentráciou proteínu – objem 10 ml

Po použití sme peristaltickú pumpu premyli destilovanou vodou, aby v nej nezaschli soli.



Obrázok 11: Peristaltická pumpa – separácia proteínu

Imunizácia

Proces imunizácie

Na imunizáciu boli použité 3 biele laboratórne myši kmeňa BALB/C na každý antigén. Myši boli objednané a ponechané na aklimatizáciu 2 týždne. Po dvoch týždňoch bola spravená 1. imunizácia. Na imunizačnú dávku sa použilo 75 ul Freudnova kompletného adjuvans a 75 ul antigénu o koncentrácii minimálne 0,1 mg/ml. Celkový objem imunizačnej dávky bol 150 ul, pričom sa neodporúča viac ako 200ul. Pred použitím sa antigén a adjuvans dokonale zmiešali na emulziu. Tá bola následne aplikovaná pod kožu myši v krčnej oblasti. Po 4 týždňoch sa imunizácia zopakovala s použitím Freundova nekompletného adjuvans rovnakým spôsobom.

Časový harmonogram imunizácie

Tabuľka 1: Harmonogram imunizácie

1. imunizácia	13.12.2018
2. imunizácia	3.1.2019
3. imunizácia	5.2.2019
4. imunizácia	4.3.2019
Odoberanie sleziny	7.3.2019

Kontrola imunizácie

Po druhej a tretej imunizácii bolo skontrolované, či naimunizovaná myš produkuje príslušné protilátky. Na túto kontrolu bola spravená metóda Western Blot. Z myši bola odobraná krv. Myš sme najskôr nahrali pod lampu, aby sa roztiahli cievy a zvýšil prietok krvi. Následne sme žiletkou opatrne narezali chvostík a odobrali približne 50-100 ul krvi do skúmavky. Krv sme nechali 3 hodiny ležať pri izbovej teplote a odstredili 8 minút pri 5000g. Získané sérum sme odpipetovali a použili ako primárnu protilátku na western blot.

Elektroforéza

Príprava gélov

1. Boli napipetované komponenty podľa % gélu z tabuľky, ktorý požadujeme.
2. Na jeden kompletný gél je potrebné 5 ml gélu a 2,5 ml zaostrovacieho gélu.
3. 10% ABS a Temed bolo pridané tesne pred naliatím do foriem (gél: 10 ml: 100 ul ABS a 5 ul Temed, zaostrovací gél: 10 ml: 100 ul ABS a 10 ul Temed)
4. Po naliatí gélu do foriem bola pridaná malá vrstvu iso-butanolu (asi 0,5 cm), pokiaľ gél nestuhol.
5. Po stuhnutí bol odsatý iso-butanol a bol nahradený ekvilibračným roztokom.
6. Po odsatí ekvilibračného roztoku bol naliatí zaostrovací gél a pridaný rebríček. Nechame asi 20 minút stáť dokým gél nestuhne.

Tabuľka 2: Príprava PAGE-SDS gélu

%	7,5	10	12	15
Voda	4,75 (ml)	20,3	17	2,5
Tris-HCl (pH=8,8)	2,5	12,5	12,5	2,5
Akryl amid 30%	2,65	16,7	20	5
SDS	0,1	0,5	0,5	0,1

Tabuľka 3: Príprava zaostrovacieho gélu

%	5 - zaostrovací
Voda	28,7 (ml)
Tris-HCl (pH=6,8)	12,5
Akryl amid 30%	8,3
SDS	0,5

Elektroforéza

Pripravený gél bol daný do elektroforetickej vaničky. Gél bol zaliatí až po vrch elektrodovým pufrom. Do gélu boli napipetované jednotlivé vzorky (15 µl) a bol pridaný marker (4 µl). Elektroforéza 20 minút pri 80 V, potom bolo zvýšené napätie na 100 V.

Farbenie gélu

Gél bol opatrne prenesený do misky a k nemu bolo priliatych asi 50 ml farbiaceho roztoku. Miska bola zakrytá viečkom a alobalom. Farbenie prebiehalo cez noc pri izbovej teplote. Po dokončení bol farbiaci roztok zliati pre ďalšie použitie.

Odfarbenie gélu

Gél bol premytý 3x odfarbovacím roztokom rýchlo a následne 3x po 30 minút.



Obrázok 12: Odfarbovanie gélov

Fúzia

Kultivácia myelomových buniek SP-2 buniek

Bunky boli z kryoskúmavky rozmrazené pridaním 1 ml média a opatrným pipetovaním prenesené do 9 ml kultivačného média v skúmavke. Bunky boli centrifugované pri 4000g/min 5 minút. Supernatant bol zliaty a bunky boli rozpipetované v 1 ml kultivačného média a prenesené do kultivačnej banky s filtrom. Objem média bol doplnený na 10 ml. Potom boli kultivované pri 37°C v kultivačnom boxe v 5% CO₂. Bolo použité kultivačné médium RPMI-1640 s 20% FBS a 1% antibiotikom Penicillin Streptomycin (ATB). Po treťom dni kultivácie im bolo vymenené médium a potom každý deň im pridané nové médium s FBS. Pri výmene média bolo predošlé médium odpipetované a opatrne (aby sme nepoškodili vrchnú vrstvu buniek) napipetované nové médium. Začiatok kultivácie bol 10 dní pred fúziou.

Príprava feederu

Na feeder boli použité BALB/C myši staré približne 20 týždňov, samičky. Na každý antigén boli použité 2 myši. Myšiam bola otvorená brušná dutina sterilnými nožničkami a do nej sa nalialo studené RPMI-médium bez fetálneho séra s obsahom antibiotík. Po vypláchnutí brušnej dutiny bolo médium z brušnej dutiny odsaté injekčnou striekačkou. Získané feedrové bunky boli stočené v chladenej centrifúge 5 minút pri 1000 otáčkach za minútu. Supernatant bol zliaty a sediment bol rozsuspendovaný v 50 ml média s 10% FBS a 1% ATB. Toto médium bolo nakvapkané do 96-jamkovej doštičky. Médium so získanými makrofágmi boli ponechané pri 37°C v kultivačnom boxe cez noc.

Vlastná fúzia

Imunizovaná myš bola usmrtená a následne jej bola odobraná krv na sérum. Krv bola nechaná 3 hodiny ležať pri izbovej teplote a odstredená 8 minút pri 5000g. Získané sérum sme odpipetovali a použili ako primárnu protilátku na Western blot. Myš bola následne

poliata 70% ethanolom, sterilnými nástrojmi bola odobraná slezina a prenesená do novej Petriho misky. Pomocou injekčných striekačiek bolo do sleziny urobené diery, spravil sa preplach sleziny médiom RPMI-1640 bez séra s 1% ATB pri izbovej teplote a nakoniec bola slezina sterilnými nástrojmi roztrhaná na kúsky. Supernatant bol prenesený do sterilných univerzálnych skúmaviek a centrifugovaný 10 minút pri 1000ot./min. Medzitým boli sp-2 bunky trepaným odlepené z dna skúmavky a rovnako prenesené do sterilných univerzálnych skúmaviek a centrifugované 10 minút pri 1000ot./min. Obe skúmavky boli opäť prepláchnuté 20 ml čistého média a centrifugované 10 minút pri 1000ot./min. Medzitým boli spočítané sp-2 bunky na Burkerovej komôrke a splenocyty boli spočítané prietokovým cytometrom. Po odstránení supernatantu boli obe bunky rozsuspendované v 20 ml média, zmiešané dokopy v pomere 5:1 (splenocyty: myelomové bunky) a centrifugované 7 minút pri 1200ot./min. Po centrifugácii bol supernatant odstránený, sediment zľahka rozsuspendovaný v kvapke média a za stáleho pomalého otáčania skúmavky bol pridávaný 50%polyetylén glykol (PEG) o celkovom objeme 0,8 ml po dobu jednej minúty. Po jeho pridaní bola skúmavka otáčaná pozvoľne ešte 1 minútu. Potom bolo pomaly pridávané médium, prvú minútu 1 ml, druhú minútu 2 ml, tretiu minútu 3 ml a štvrtú minútu 4 ml pri stálom otáčaní skúmavky. Výsledná zmes buniek bola centrifugovaná 6 minút pri 1000ot./min. Supernatant bol zliaty a sediment bol rozpipetovaný v 50 ml RPMI-1640 média s 20% FBS a 1% ATB. Výsledná suspenzia bola rozkvapkaná do 96-jamkových doštičiek s pripraveným feedrom. Na tretí deň bolo do každej jamky pridané po jednej kvapke selekčného média a na siedmy deň bolo médium odstránené a vymenené za nové. Po desiatich dňoch boli niektoré kolónie vhodné na testovanie metódami ELISA a Western blot. Nevyužíte sp-2 bunky boli zmrazené v zmrazovacom médiu pre ďalšie použitie.

Selekcia hybridomov

Selekcia prebehla pomocou selekčného média. Do RPMI-1640 bolo pridané 1%ATB a 1% HAT suplement. Médium bolo prikvapkované tretí deň po fúzii. Jamky s narastenou kolóniou hybridomov bola doplnená selekčným médiom a pri dostatočnej koncentrácii buniek boli prenesené na 6-jamkovú doštičku. Supernatant z hybridomov o veľkej koncentrácii bol odobraný na testovanie.

Kontrola produkcie protilátok

ELISA

Do 96-jamkovej doštičky bol napipetovaný krycí pufor o objeme 100 ul spolu s primárnou protilátkou. Doštička bola ponechaná v chladničke pri 4°C cez noc. Roztok bol z doštičky vyliaty a jamky boli premyté premývacím pufrom 3x. Do jamiek bolo napipetovaných 100 ul blokačného pufru. Doštička bola na trepačke pri izbovej teplote 1 hodinu. Roztok bol z doštičky vyliaty a jamky boli opäť premyté premývacím pufrom 3x. Do každej jamky bolo pridaných 100 ul antigénu. Doštička bola na trepačke pri izbovej teplote 2 hodiny. Roztok bol z doštičky vyliaty a jamky boli premyté premývacím pufrom 3x. Do každej jamky bolo pridaných 100 ul sekundárnej protilátky. Doštička bola na trepačke pri

izbovej teplote ešte 1 hodinu. Roztok bol z doštičky vyliaty a jamky boli premyté premývacím pufrom 5x. Do každej jamke bolo pridaných 100 μ l TMB. Doštička bola uložená v tme 30 minút. Reakcia bola zastavená pridaním 100 μ l roztoku HCl o koncentrácii 1M. Bola meraná absorbanca pri 450 nm.

WESTERN BLOT

Elektroforéza:

Pripravený gél bol daný do elektroforetickej vaničky. Gél bol zaliaty až po vrch elektrodoým pufrom. Do gélu boli napipetované jednotlivé vzorky (15 μ l) a bol pridaný marker (4 μ l). Prebehla elektroforéza 20 minút pri 80 V, potom bolo zvýšené napätie na 100 V. Celkový čas elektroforézy bol 2 hodiny.

Blotting:

Boli pripravené veci na blotovanie – miska, valček, vankúšiky, mriežka, orezávatko, membrána (nitrocelulóza), filtračné papiere. Do misky bol naliaty transférový pufor. Doň bola vložená mriežka a vankúšiky – prebytočné bubliny boli vytlačené valčekom (mohli by negatívne ovplyvniť výsledok). Vkladáme mriežkou naspodok – poradie: mriežka, vankúšik, filtračný papier, gél, membrána, filtračný papier, vankúšik. Gél po elektroforéze bol orezaný od spodnej časti a zaostrovacieho gélu orezávatkom a položený na filtračný papier. Naň bola položená opatrne membrána, filtračný papier a vankúšik a boli vytlačené posledné bubliny. Mriežka bola zaistená a vložená do nádoby na blotting. Transférový pufor bol vychladený v chladničke pri -4°C a nádobka bola navyše obložená ľadom pre lepšiu odvod tepla. Do nádoby bola vložená mriežka, chladitko s chladiacou kvapalinou a zalejeme transférovým pufrom. Aparatúra bola zapnutá pri 100 V na 1 hodinu.

Primárne protilátky:

Vzniknutá membrána bola opatrne presunutá pinzetou do nádoby s pripraveným 0,5% blokačným pufrom a ponechaná 1 hodinu na kývačke. Následne bola membrána vybratá, rozstrihnutá a vložená do skúmaviek. Bol pridaných 1-3 ml premývacieho pufru a primárne protilátky a ponechané v chladničke pri 4°C aspoň 12 hodín.

Sekundárne protilátky:

Membrány boli rýchlo premyté 3x a následne 3x po 10 minút premývacím pufrom. Potom bolo pridaných 1-3 ml blokačného pufru a sekundárne protilátky. Membrány boli ponechané v sekundárnej protilátke hodinu pri izbovej teplote. Membrány boli opäť rýchlo premyté 3x a následne 3x po 10 minút premývacím pufrom. Na fotografickú dosku boli rýchlo umiestnené jednotlivé membrány.

Vyvolávanie:

Na jednu membránu bolo použitých asi 1 ml pripraveného substrátu. Substrát bol pipetou rovnomerne rozmiestnený po povrchu membrán a bol ponechaný na povrchu 1 minútu. Potom bol substrát odsatý filtračným papirom a fotografická doska bola uzavretá. Vo fotografickej komore bol na povrch membrán položený fotografický papier. Po uplynutí

expozičnej doby (1 minúta, 5 minút...) bol filtračný papier odobraný a ponorený do roztoku vývojky. Okamžite po zobrazení tmavých pruhov na fotopapieri bol opláchnutý vo vode a presunutý do ustalovaču. Akonáhle bol fotopapier priehľadný, mohol byť opláchnutý v destilovanej vode a presunutý na vonkajšie svetlo na vyhodnotenie.

Imunoprecipitácia

Príprava proteínových vzorkov

Vzorky mozgu a semenníkov dospelého samca myši boli odobrané do skúmaviek, ku ktorým bol pridaný NP-40 pufr o objeme 500 ul. Tesne pred pridaním pufru k vzorkám boli k nemu pridané inhibítory proteáz. Na 1 ml NP-40 pufru bolo pridaných 5 ul.

Na reakciu boli použité agarózové guľičky s viazaným G-proteínom v 20% etanole. Tie boli najskôr rozuspendované a prenesené do skúmavky so 650 ul NP-40 pufru. Ich objem by mal byť približne 1/3 skúmavky. Guľičky boli 3x prečistené v NP-40 pufru, aby sa odstránil nežiaduci ethanol, ktorý by mohol zrážať protilátky.

Pipetovanie vzoriek

Vzorky 1-8 boli napipetované podľa tabuľky. Vzorky 1 a 4 boli negatívne kontroly pre testes a mozog, vzorky 7 a 8 boli pozitívne kontroly pre testes a mozog s protilátkou vhodnou na imunoprecipitáciu. Pre každú vzorku bol spravený objem 500 ul.

Tabuľka 4: Vzorky na imunoprecipitáciu

číslo	vzorka	Lyzát (ul)	sérum	guľičky	NP-40 pufr
1	Testes – NK	60	0	80	340
2	Testes – sérum C	60	20	80	320
3	Testes – sérum N	60	20	80	320
4	Mozog – NK	60	0	80	340
5	Mozog – sérum C	60	20	80	320
6	Mozog – sérum N	60	20	80	320
7	Testes – PK	60	10	80	330
8	Mozog – PK	60	10	80	330

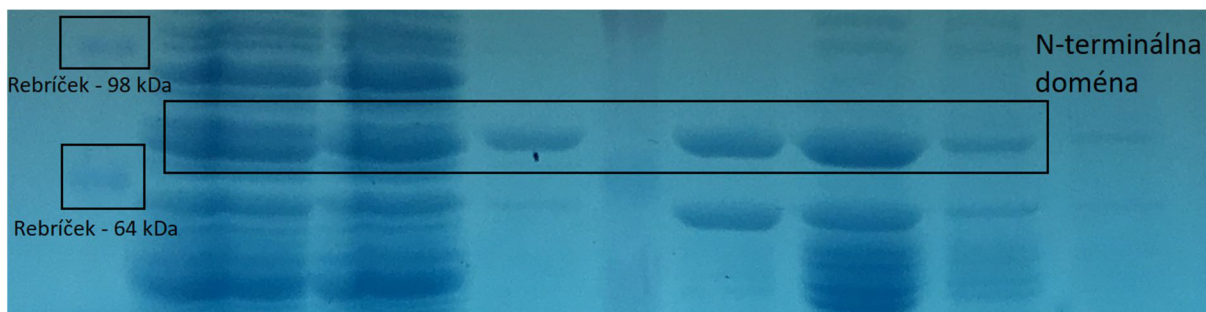
Vzorky boli po zmiešaní nechané precipitovať 2 hodiny pri izbovej teplote a 3 hodiny v chladničke pri teplote 4 °C. Následne boli vzorky 3x premyté v NP-40 pufru. Po treťom premytí bol ku guľičkám pridaný 15 ul Lemli roztoku. Potom bol roztok zahriaty na 95°C po dobu 5 minút a uchovaný v mrazáku pri -4°C. Vzorky boli nasledujúci deň rozmrazené, krátko zcentrifugované a napipetované na gél na Western blot.

VÝSLEDKY

Produkcia a čistenie antigénu

Najprv bolo treba získať antigén pre imunizáciu myší. Preto bol do plazmidu baktérie *Escherichia coli* bol vložený gén na produkciu antigénu N-terminálnej alebo C-terminálnej domény CDK13. Následne boli baktérie kultivované a ich rast bol sledovaný nefelometricky. Pri dostatočnej hustote buniek bola kultivácia ukončená. V rámci hustoty buniek sa bunky produkujúce rôzne antigény nelíšili a ich celkový počet bol teda približne rovnaký. Vlastný antigén bol produkovaný pri nadbytku substrátu – glukózy.

Produkcia N-terminálnej a C-terminálnej sa značne líšila, čo môžeme sledovať na obrázku 13 a obrázku 15. Na obrázku 13 môžeme vidieť produkciu N-terminálnej domény, ktorá po prečistení je väčšom množstve, ale zároveň menej čistá – obsahuje veľké množstvo nežiadúcich proteínov. Po prečistení opúšťal antigén kolónu skôr – vo frakciách 6 až 11 a jeho množstvo bolo vyššie ako antigénu C, ktorý z kolóny vychádzal až od frakcie 7.



Obrázok 13: N-terminálna doména - expresia



Frakcie:

11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Obrázok 14: N-terminálna doména po prečistení



Obrázok 15: C-terminálna doména - expresia

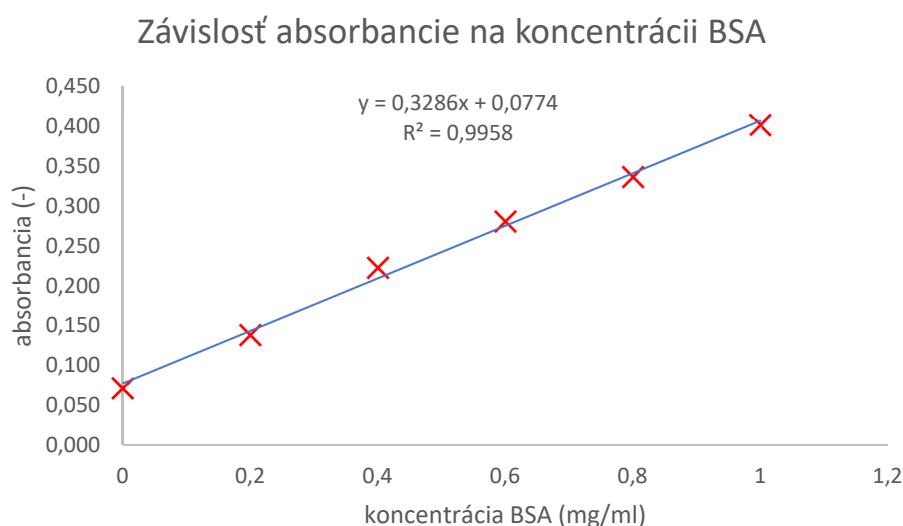


Frakcie: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Obrázok 16: C-terminálna doména po prečistení

Meranie obsahu proteínu vo frakciách

Jednotlivé frakcie boli odobrané do skúmaviek a bola v nich meraná koncentrácia antigénu. Táto koncentrácia bola potrebná pre imunizáciu myši, kde pri imunizácii veľkým množstvom proteínu môže prísť k šoku a daná myš nemusí imunizáciu prežiť. Naopak malá koncentrácia môže spôsobiť to, že nedôjde k vyvolaniu dostatočnej imunitnej odpovede v myši. V prvom kroku bola spravená kalibračná krivka závislosti absorbancie na koncentrácii BSA (hovädzí sérový albumín). V druhom kroku bola získaná hodnota kalibračnej krivky použitá na výpočet koncentrácie antigénu v jednotlivých frakciách. Jednotlivé frakcie boli 10x nariedené.



Obrázok 17: Kalibračná krivka koncentrácie BSA

Tabuľka 5: Absorbancia pre rôzne koncentrácie BSA

Koncentrácia BSA (mg/ml)	A ₁ (-)	A ₂ (-)	A _{priemer} (-)
0	0,074	0,069	0,072
0,2	0,139	0,138	0,139
0,4	0,223	0,222	0,223
0,6	0,282	0,279	0,281
0,8	0,334	0,338	0,336
1	0,398	0,405	0,402

Tabuľka 6: Absorbancia pre vzorky antigénu C a N

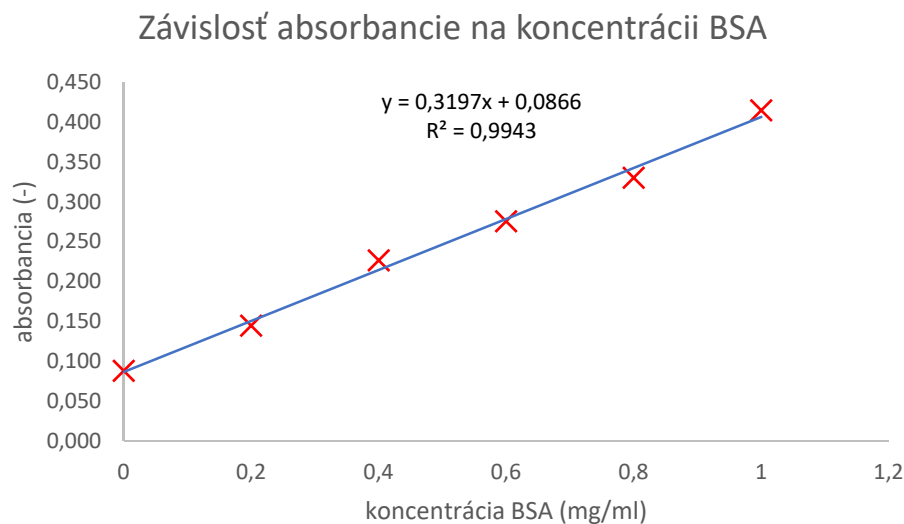
Antigén C	A ₁ (-)	A ₂ (-)	A _{priemer} (-)	Koncentrácia antigénu (mg/ml) – riedený 10x	Výsledná koncentrácia antigénu (mg/ml)
1	0,095	0,098	0,097	0,058	0,581
2	0,105	0,107	0,106	0,087	0,870
3	0,098	0,101	0,100	0,067	0,673
4	0,099	0,098	0,099	0,064	0,642
5	0,133	0,129	0,131	0,163	1,631
Antigén N	A ₁ (-)	A ₂ (-)	A _{priemer} (-)	Koncentrácia antigénu (mg/ml) – riedený 10x	Výsledná koncentrácia antigénu (mg/ml)
1	0,151	0,149	0,150	0,221	2,209
2	0,288	0,283	0,286	0,633	6,333
3	0,141	0,146	0,144	0,201	2,012
4	0,124	0,122	0,123	0,139	1,388
5	0,107	0,121	0,114	0,111	1,114

Pre potreby imunizácie boli zvolené 2 frakcie z každého antigénu s najvyššou koncentráciou proteínu. V Tabuľka 6: Absorbancia pre vzorky antigénu C a N sú označené hrubým písmom.

Zakoncentrovanie frakcií s najvyšším obsahom antigénu

Vzhľadom na pomerne nízke koncentrácie antigénu vo frakciách bolo potrebné jednotlivé frakcie zakoncentrovať. Na zakoncentrovanie boli použité skúmavky s filtrom na 30 kDa v centrifúge (4000g/5minút). Po zakoncentrovaní boli jednotlivé frakcie opäť zmerané na množstvo antigénu.

Meranie koncentrácie prebehlo na spektrometre pri 540 nm. Do 96-jamkovej doštičky bolo najskôr napipetovaných 5 ul proteínu a následne 200 ul zmesi roztoku síranu meďnatého a bicinchonínovej kyseliny v pomere 1:50. Doštička bola následne umiestnená do kultivačného boxu na 30 minút pri 37°C. Po vybratí bola meraná absorbancia.



Obrázok 18: Kalibračná krivka koncentrácie BSA

Tabuľka 7: Absorbancia pre vzorky antigénu C a N

Koncentrácia BSA (mg/ml)	A ₁ (-)	A ₂ (-)	A _{priemer} (-)
0	0,089	0,087	0,088
0,2	0,145	0,144	0,145
0,4	0,227	0,226	0,227
0,6	0,273	0,278	0,276
0,8	0,327	0,333	0,330
1	0,418	0,411	0,415

Tabuľka 8: Absorbancia pre vzorky antigénu C a N

Antigén C	A ₁ (-)	A ₂ (-)	A _{priemer} (-)	Koncentrácia antigénu (mg/ml) – riedený 10x	Výsledná koncentrácia antigénu (mg/ml)
2	0,121	0,124	0,123	0,114	1,139
5	0,114	0,128	0,121	0,108	1,076
Antigén N	A ₁ (-)	A ₂ (-)	A _{priemer} (-)	Koncentrácia antigénu (mg/ml) – riedený 10x	Výsledná koncentrácia antigénu (mg/ml)
1	0,201	0,206	0,204	0,367	3,672
2	0,368	0,378	0,373	0,896	8,958

Použité množstvo antigénu na imunizáciu

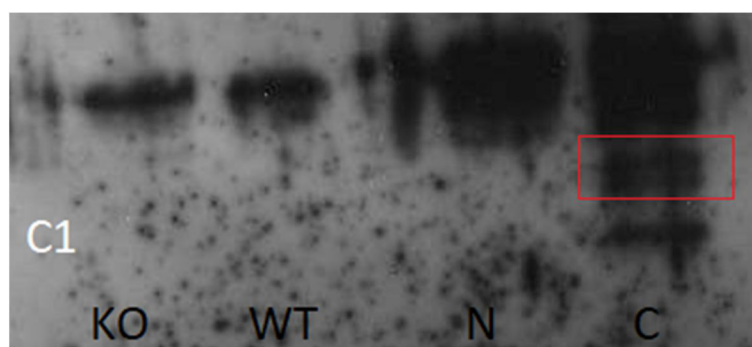
V tabuľke je znázornené množstvo antigénu použitého na imunizáciu, pričom vzhľadom na vyšší výťažok antigénu N bolo použité väčšie množstvo. Objem použitého antigénu bolo 75 ul spolu s 75 ul adjuvans.

Tabuľka 9: Množstvá antigénu využité na imunizáciu

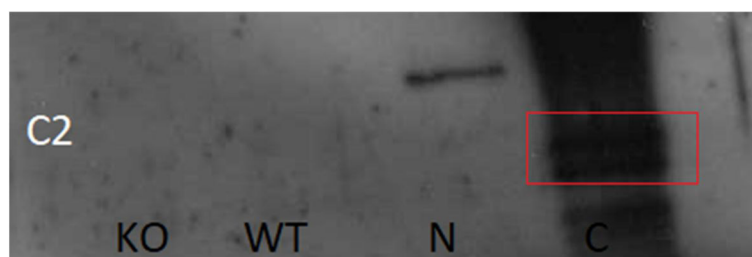
	Číslo použitej frakcie - N	Množstvo antigénu (mg)	Číslo použitej frakcie - C	Množstvo antigénu (mg)
1. Imunizácia	N1	0,2754	C5	0,08073
2. Imunizácia	N1	0,2754	C5	0,08073
3. Imunizácia	N2	0,6719	C2	0,08539
4. imunizácia	N2	0,6719	C2	0,08539

Kontrola imunizácie

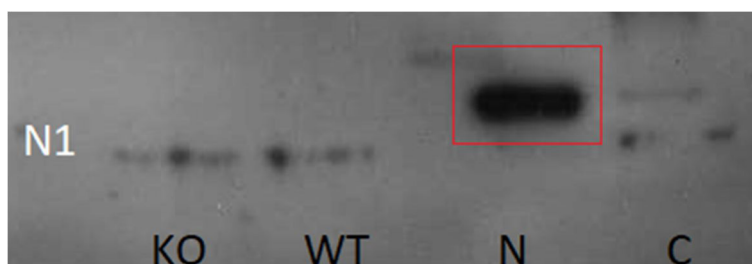
Pred fúziou bolo odobrané malé množstvo krvi z imunizovaných myší a urobená metóda Western blot. Výsledok tejto metódy bola informácia o tom, či daná myš produkuje protilátku proti C-terminálnej alebo N-terminálnej doméne CDK13. Na obrázku 19 až obrázku 23 bola sledovaná interakcia protilátky na WT (wild-type) a KO (knock-out) myšiaciu vzorku mozgu. Ako sekundárna protilátka bolo použité sérum z imunizovanej myši nariedené 1:500 a sekundárna protilátka HRP nariedená 1:3000.



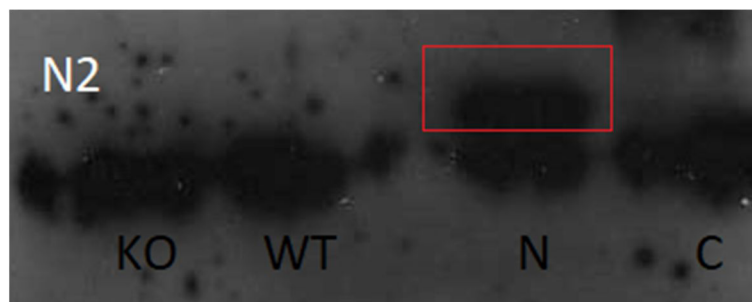
Obrázok 19: kontrola produkcie protilátky myši C1 (1:500)- expozícia (1 minúta)



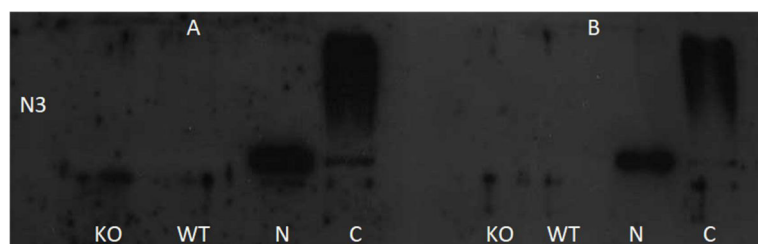
Obrázok 20: kontrola produkcie protilátky myši C2 (1:500)- expozícia (1 minúta)



Obrázok 21: kontrola produkcie protilátky myši N1 (1:500)- expozícia (1 minúta)



Obrázok 22: kontrola produkcie protilátky myši N2 (1:500)- expozícia (1 minúta)



Obrázok 23: kontrola produkcie protilátky myši N3 – A) 1:500, B) 1:1000 - expozícia (1 minúta)

Fúzia buniek

Fúzia buniek bola rozvrhnutá do 2 týždňov. 10 dní pred fúziou bola začatá kultivácia sp-2 buniek, aby ich množstvo bolo na fúziu dostatočné. 4 dni pred fúziou im bolo menené kultivačné médium na dennej báze, kvôli dostatku živín a zvýšenému metabolizmu. 1 deň pred fúziou boli pripravené feedrové bunky do 96-jamkových doštičiek. Po odobraní sleziny a preplachu brušnej dutiny kultivačným médiom boli biele krvinky spočítané prietokovým cytometrom. Sp-2 bunky boli rázne strasené zo dna kultivačnej banky a spočítané Bürkerovou komôrkou.

1.imunizácia - 14.3.2019 pre antigén C

Biele krvinky (WBC) – počítané prietokovým cytometrom

Sp-2 bunky – počítané Bürkerovou komôrkou

Myš č.1:

Tabuľka 10: množsvá buniek sp-2 a splenocytov použitých na myš 1 – antigén C

		Objem média (ml)	Celkové množstvo buniek
Množstvo bielych krviniek	$5,7 \cdot 10^9 \text{ l}^{-1}$	16	$91,2 \cdot 10^6$
Množstvo sp-2 buniek	$2,0 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$	16	$32,0 \cdot 10^6$

Myš č.2:*Tabuľka 11:: množsvá buniek sp-2 a splenocytov použitých na myš 2 – antigén C*

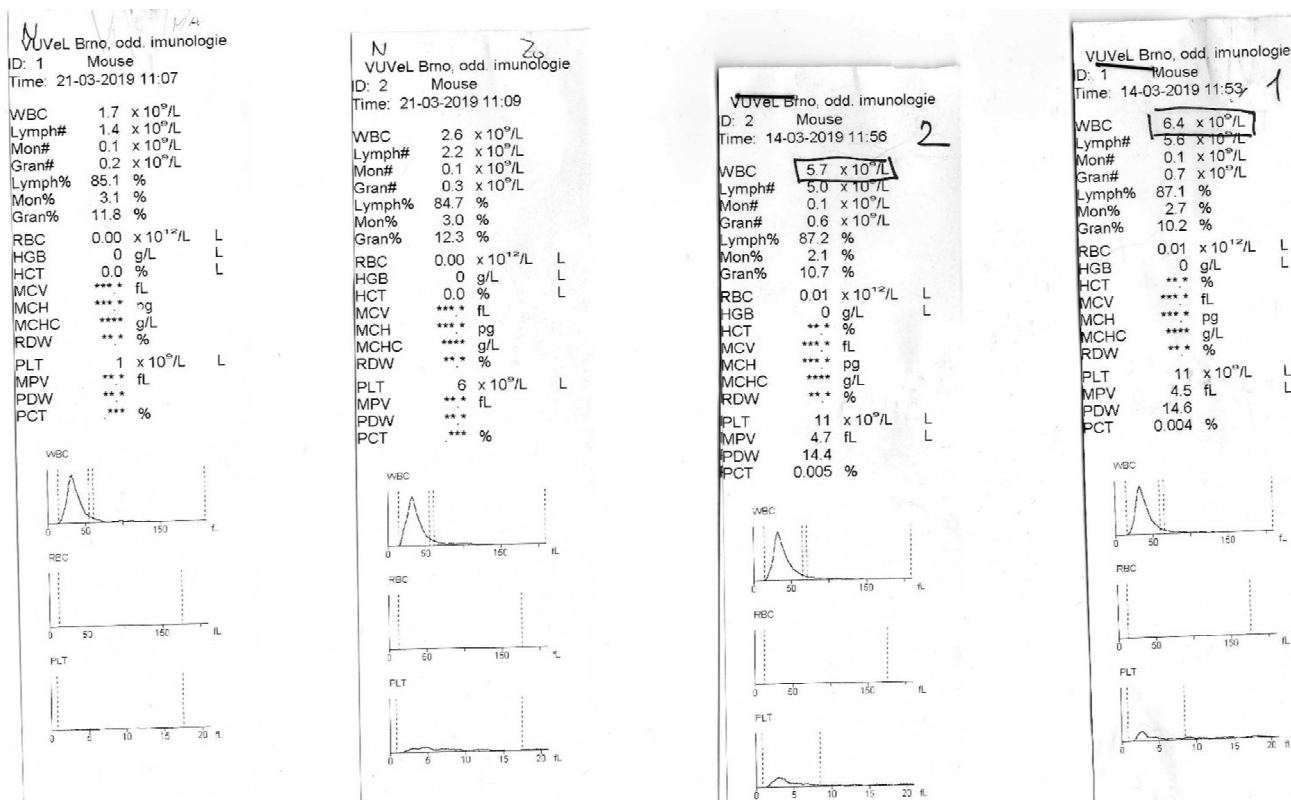
		Objem média (ml)	Celkové množstvo buniek
Množstvo bielych krviniek	$6,4 \cdot 10^9 \text{ l}^{-1}$	16	$102,4 \cdot 10^6$
Množstvo sp-2 buniek	$1,1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$	16	$17,8 \cdot 10^6$

2.imunizácia - 21.3.2019 pre antigén N**Myš č.1:***Tabuľka 12: množsvá buniek sp-2 a splenocytov použitých na myš 1 – antigén N*

		Objem média (ml)	Celkové množstvo buniek
Množstvo bielych krviniek	$2,6 \cdot 10^9 \text{ l}^{-1}$	25	$65 \cdot 10^6$
Množstvo sp-2 buniek	$63,0 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$	42,5	$26,8 \cdot 10^6$

Myš č.2:*Tabuľka 13: množsvá buniek sp-2 a splenocytov použitých na myš 2 – antigén N*

		Objem média (ml)	Celkové množstvo buniek
Množstvo bielych krviniek	$1,7 \cdot 10^9 \text{ l}^{-1}$	20	$34 \cdot 10^6$
Množstvo sp-2 buniek	$64,2 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$	37	$23,7 \cdot 10^6$

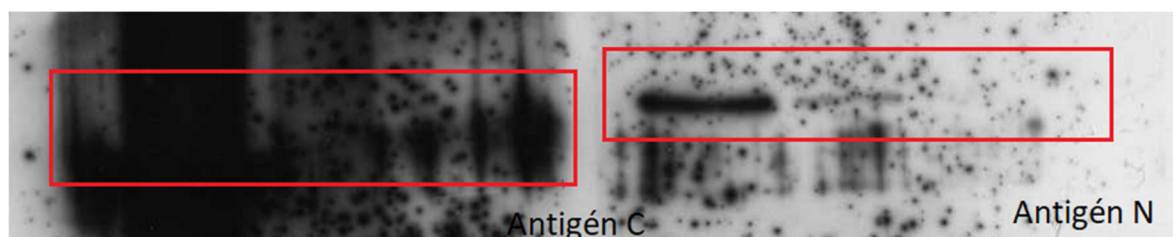


Obrázok 24: množstvá splenocytov (WBC) merané prietokovým cytometrom

Optimalizácia metódy Western blot pre jednotlivé antigény C a N

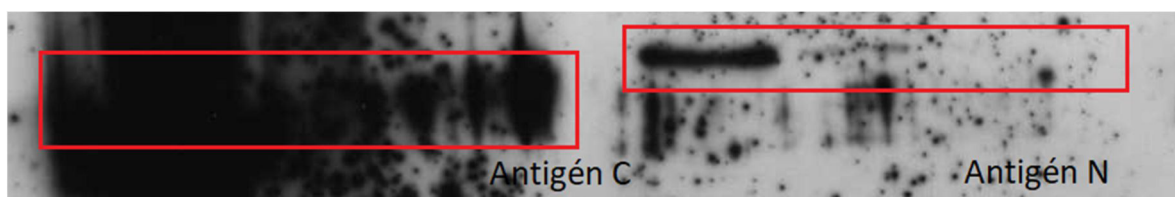
Pre potreby následnej pozitívnej kontroly pri testovaní antigénov bol spravený Western blot na antigény C-terminálnej a N-terminálnej domény pre rôzne koncentrácie. Ako primárna protilátka bolo použité sérum z naimunizovanej myši nariedené 1:1000 a sekundárna protilátka HRP anti-mouse protilátka nariedená 1:2000. Z obrázku 27a môžeme usúdiť, že sérum imunizovanej myši na C-terminálnu doménu bolo pomerne znečistené a antigén je vidieť len pri riedení 1:10, pričom prúžok je slabý a značne ho prekrýva pozadie. Antigén N bol sérom detekovaný na najlepšiu koncentráciu pre Western blot 1:10, pričom aj pri koncentrácii 1:100 je stále detekovateľný. Expozícia fotofilmu bola spravená 1 minúta, 5 minút a 40 minút.

A



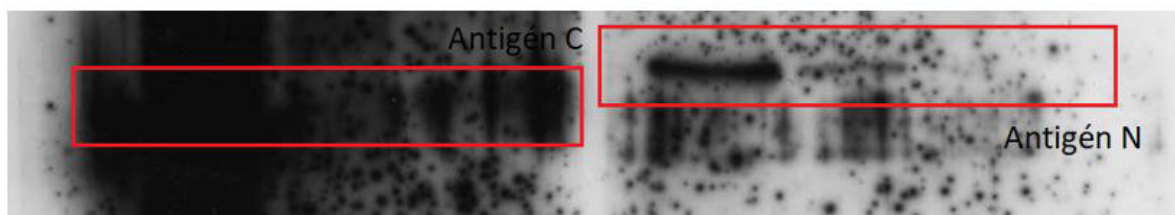
Obrázok 27a: rôzne koncentrácie antigénu – expozícia 1 minút

B



Obrázok 27b: rôzne koncentrácie antigénu – expozícia 5 minút

C

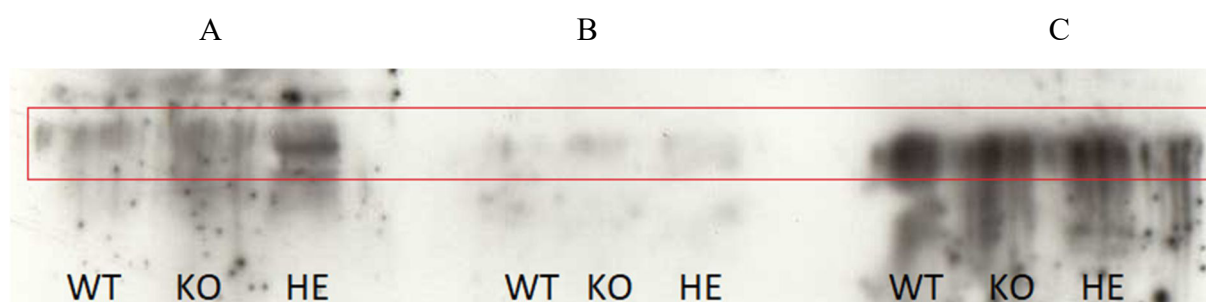


C: 1:10 1:100 1:1000 N: 1:10 1:100 1:1000

Obrázok 27c: rôzne koncentrácie antigénu – expozícia 40 minút

Testovanie sér získaných z imunizovaných myši

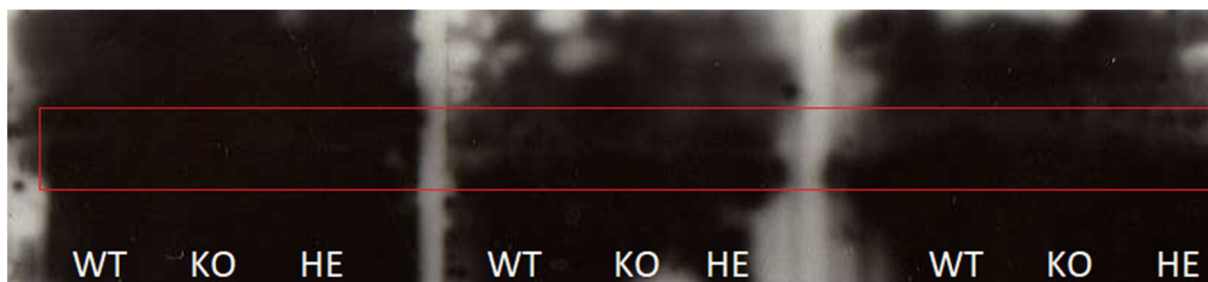
Sérum získané z imunizovaných myši bolo testované pomocou metódy Western blot. Touto metódou bolo overené, či dané sérum je vhodné použiť pri detekcii CDK13 vo vzorkách myši. Ako sekundárnu protilátku bola použitá HRP protilátka nariadená 1:2000. Z obrázku 25 a obrázku 26 môžeme vidieť, že jednotlivé vzorky síce dávajú odpoveď na sérum, ale nie je žiadny rozdiel medzi vzorkami WT, KO a HE.



Obrázok 25: A) test séra N myši (1:500), B) test séra N myši (1:1000), C) test séra C myši (1:1000) – expozícia (1 minúta)



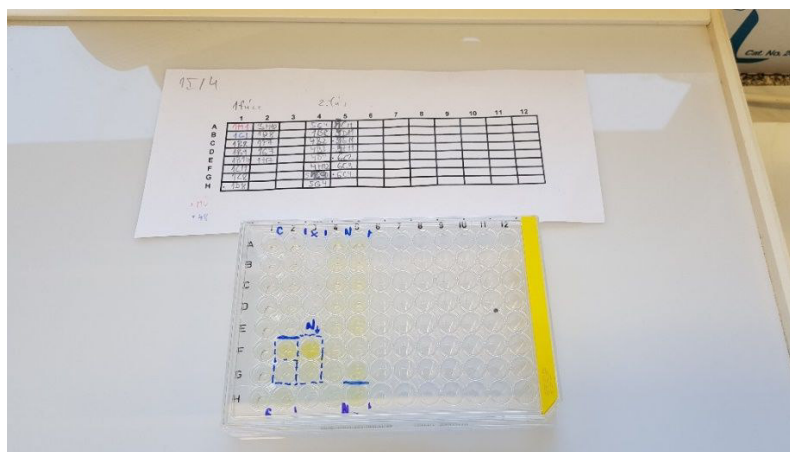
Obrázok 26: A) test séra N myši (1:500), B) test séra N myši (1:1000), C) test séra C myši (1:1000) – expozícia (5 minút)



Obrázok 27: A) test séra N myši (1:500), B) test séra N myši (1:1000), C) test séra C myši (1:1000) – expozícia (20 minút)

Testovanie hybridomov

Najskôr bola spravená metóda ELISA, ktorá nám dala opakovane pozitívnu kontrolu na vzorky supernatantov získaných z hybridomov. Tieto pozitívne vzorky sú uvedené v tabuľke 15 rovnako z označením použitým na metódu Western blot. Sekundárna protilátka bola použitá HRP anti-mouse protilátka nariedená 1:2000. Hodnoty z obrázku 28 boli prevedené do tabuľky 14.



Obrázok 28: ELISA - kontrola produkcie protilátok

Ako primárna protilátka pri metóde Western blot bolo použité sérum z imunizovanej myši nariedené 1:250 a sekundárna protilátka HRP anti-mouse protilátka nariedená 1:2000. Expozícia fotofilmu bola spravená 1 minúta a 40 minút. Vedľa hybridomu bola spravená kontrola na myšiu proteín CDK13 u wild-type myši (WT), knock-out myši (KO) a heterozygota (HE).

Tabuľka 14: Výsledky metódy ELISA na vzorkách supernatantov odobraných z hybridomových buniek

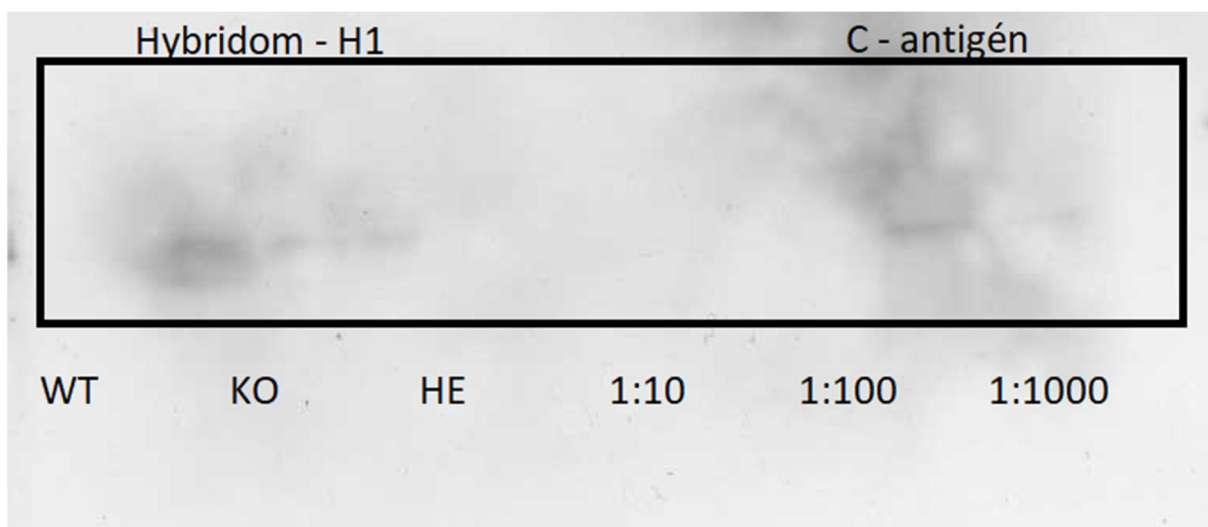
	1	2	3	4	5
A	0,061	0,066	-	0,118	0,111
B	0,067	0,090	-	0,142	0,161
C	0,061	0,087	-	0,122	0,169
D	0,049	0,070	-	0,117	0,159
E	0,066	0,076	-	0,131	0,190
F	0,068	0,358	0,607	0,115	0,088
G	0,070	0,085	0,090	0,101	0,243
H	0,103	0,158	-	0,101	0,200

Tabuľka 15: Vzorkov dávajúce pozitívny signál metódov ELISA

Poloha v Tabuľka 14: Výsledky metódy ELISA na vzorkách supernatantov odobraných z hybridomov	Antigén	Označenie
H1	C	H1
B2	C	C1
H2	C	C2
F2	C - PK	
G2	C - NK	
B4	N	N1
E4	N	N2
B5	N	N3
C5	N	N4
D5	N	N5
E5	N	N6
G5	N	N7
H5	N	N8
F3	N – PK	
G3	N- NK	

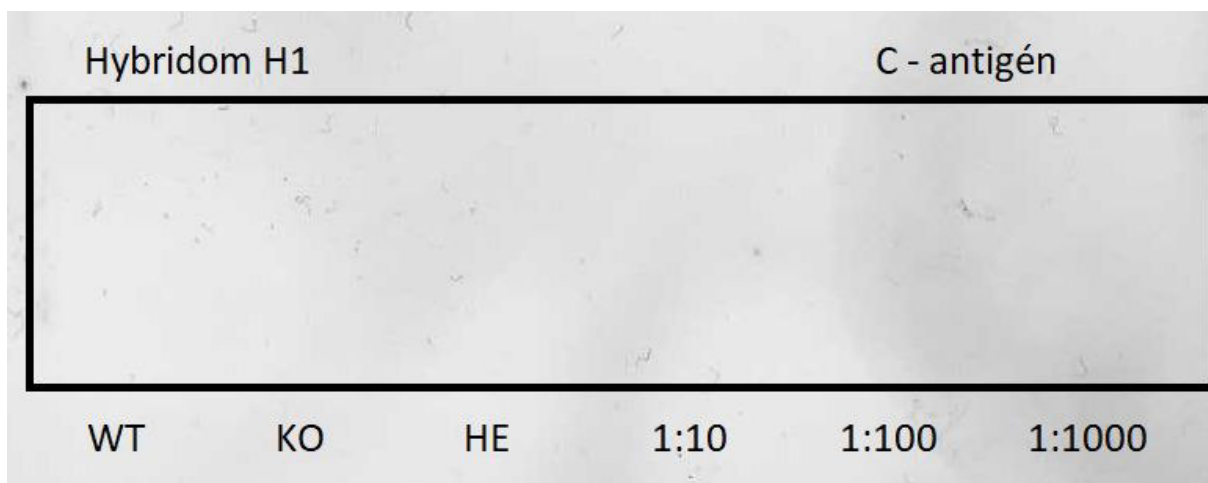
Prvý pozitívny hybridom H1 bol otestovaný aj na metóde Western blot. Ako proteín bol použitý antigén C s rôznou koncentráciou a vzorky myši. Ako môžeme vidieť na obrázku 29 tak tento hybridom neprodukoval protilátky schopné sa viazať na antigén ani na vzorky.

A



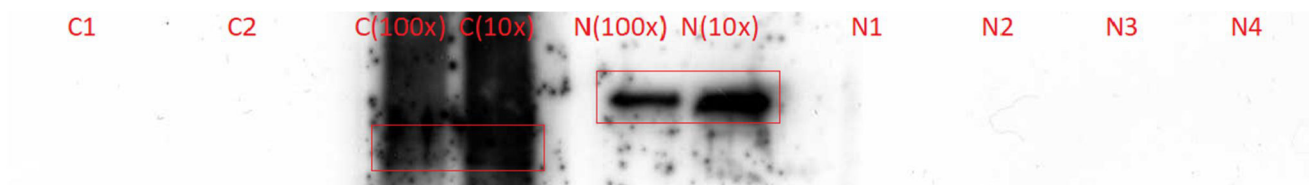
Obrázok 29: test hybridomu H1 – expozícia 1 minúta

B

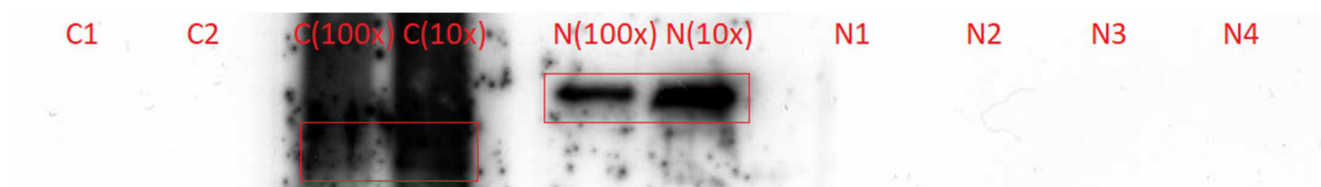


Obrázok 30b: test hybridomu H1 – expozícia 40 minút

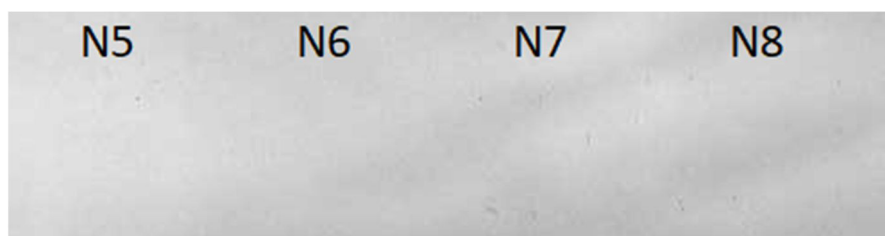
Ďalšie hybridomové kolónie boli testované na produkciu protilátok, pričom ako pozitívna kontrola bolo použité sérum z imunizovaných myší, ktoré podľa obrázku 27 dáva signál na antigén. Z obrázku 31 a obrázku 33 môžeme vidieť, že žiadna z kolóní nedáva pozitívny signál, takže sa naviažu na denaturovanú formu proteínu.



Obrázok 31: test hybridomov – expozícia 5 minút



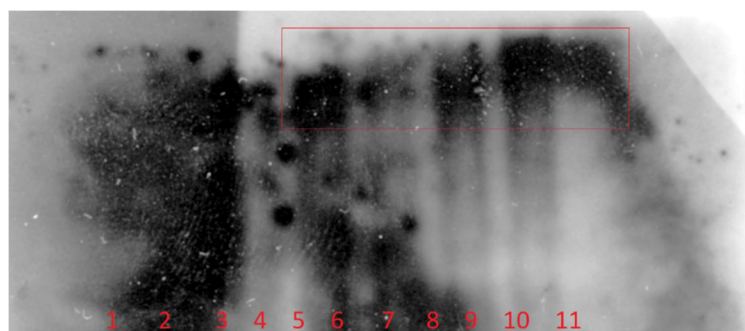
Obrázok 32: test hybridomov – expozícia 35 minút



Obrázok 33: test hybridomov – expozícia 1 minúta

Imunoprecipitácia

Na obrázku 34 môžeme vidieť, že CDK13 je schopná precipitovať (vzorky 7 a 8), pričom schopné precipitácie je aj sérum imunizovanej myši na antigén N (vzorka 6). To nám dáva možnosť testovania vzniknutých hybridomov na precipitáciu, keďže pri precipitácii sa proteín nachádza v natívnej forme (v denaturovanej forme proteínu pri metóde Western blot neboli nájdené žiadne pozitívne výsledky ako môžeme vidieť naobrázku 29, obrázku 31 a obrázku 33). Ďalšia práca z týmito vzorkami bude preto nadväzovať na výsledky diplomovej práce.



Obrázok 34: Imunoprecipitácia vzorkami z Tabuľka 4: Vzorky na imunoprecipitáciu

DISKUSIA

Cieľom práce bolo vytvoriť stabilnú kultúru hybridomov produkujúce monoklonálnu protilátku proti cyklin-dependetnej kináze 13.

Pri kultivácii buniek nastali 2 problémy. Antigén C sa exprimoval v menšom množstve a jeho čistota nebola moc vysoká. To môže byť zapríčinené jeho zlou biokompatibilitou s organizmami – pri kultivácii s bunkami *Escherichia coli* a pri následnej imunizácii s myšacím organizmom. Bunky produkujúce antigén N-terminálnej domény CDK13 boli produkované vo väčšom množstve a lepšej čistote. Štandardne boli bunky kultivované v kultivačnom boxe s trepačkou pri 22°C po dobu 12 hodín.

Imunizácia prebiehajúca antigénom C mohla byť menej úspešná z dôvodu menšieho použitia antigénu na danú imunizáciu. Pri prvej a druhej imunizácii bola použitá 3x väčšia dávka antigénu N ako pri dávke antigénu C a pri tretej a štvrtej imunizácii bola dokonca použitá až viac ako 7-násobné množstvo antigénu C oproti N, čo mohlo viesť k nedostatočnej imunitnej odpovedi. Tento postup bol použitý kvôli menšiemu množstvu antigénu C získaného z buniek z čoho vyplynula obava jeho možnej toxicity pre organizmus.

Imunizácia prebehla približne v 4-týždňových intervaloch v závislosti na časových možnostiach. Na imunizáciu bola použitá inzulínová injekcia, ktorá bola najvhodnejšia vzhľadom na jednoduchú manipuláciu a veľkosť myši. Jedna myš imunizovaná antigénom C po druhej imunizačnej dávke uhynula. Keď sa pozrieme späť na kultiváciu buniek tak zistíme, že práve antigén C sa v bunkách exprimoval v menšej miere a bol viac kontaminovaný a organizmus myši na to nezareagoval, podľa nášho predpokladu. Ostatné myši prežili bez problémov až do poslednej imunizácie a nejavili žiadne vážne zdravotné problémy. Pri odoberaní krvi na kontrolu produkcie protilátok bol naposledy skontrolovaný ich zdravotný stav pred fúziou.

Fúzia buniek prebehla bez zjavných problémov a podarilo sa nám vytvoriť hybridomové bunky. Počet jamiek na ktorých bunky prežili a dokázali sa množiť bol, oproti predošlým skúsenostiam, pomerne nízky – asi 10%. Vzhľadom na obtiažnosť/technickú náročnosť metódy je pomerne ťažké určiť chybný krok. Ten mohol byť spôsobený pri pestovaní sp-2 buniek, ktoré síce hojne rástli v médiu, ale ich rastová fáza už nemusela byť vhodná na fúziu – nenachádzali sa v exponenciálnej fázi ale stacionárnej. Rovnako mohlo dôjsť k poškodeniu niektorých splenocytov manipuláciou, kde sa bunky viackrát premývali v médiu. Rovnako mohla chyba vzniknúť pri samotnom fúzovaní, kde bunky neboli schopné

fúzie, poprípade bol PEG pridávaný rýchlo alebo bunky nedostatočne spojil, aby došlo k fúzii. Prípadná chyba mohla nastať aj v poslednom kroku, kedy zlepené bunky museli byť opatrne prepipetované do 96-jamkovej doštičky bez toho, aby sa odpútali odo dna.

Tieto hybridomy boli pasážované ďalej na 96-jamkových doštičkách. Pri dostatočnom množstve boli hybridomy prenesené do vedľajšej jamky a takto boli postupne kultivované až do väčšieho nárastu ich počtu, kedy boli prenesené do 12-jamkovej doštičky a testované. V jednotlivých krokoch bola sledovaná aj možnosť kontaminácie. Vzhľadom na to, že v médiu neboli zaznamenané žiadne iné bunky ani zákal, tak sme kontamináciu vylúčili. Jediná možná kontaminácia je kontaminácia mykoplazmatami, ktoré nie sú viditeľné rovnako ako prejavy kontaminácie. Zamedzeniu tejto kontaminácie sme sa snažili sterilnou prácou a jednotlivé kroky boli robené v sterilnom očkovačom boxe. Taktiež na jednotlivé kroky boli použité nástroje sterilizované v autokláve.

Testovanie hybridomov na produkciu protilátok prebiehalo metódou ELISA a Western blot.

Metódou ELISA sme v prvom kroku potvrdili, či v jednotlivých jamkách sú protilátky schopné viazať antigén C-termálnej alebo N-termálnej domény CDK13 do komplexu proteín-protilátka. V tomto kroku bola sledovaný signál na metóde ELISA. Hybridomy, pri ktorých sme nezaznamenali žiadny signál boli určené ako neproduktujúce protilátky proti CDK13. Vzhľadom na vysokú citlivosť metódy ELISA, si nemôžeme byť istý celkovým množstvom daných protilátok. V jednotlivých jamkách mohlo produkovať protilátky len malé množstvo buniek, ktoré v ďalších dňoch nemuseli prežiť a teda pozitívny signál získaný pri tejto metóde mohol byť len dočasný charakter. Na overenie produkcie protilátok by sme museli opakovať metódu viackrát v priebehu dní a použiť aj ďalšie metódy. Na presnejšie overenie produkcie by sme mohli jednotlivé protilátky vyzrážať. Takto vyzrážaná proteínová frakcia by bola prečistená a následne by sme pomocou metódy Western blot overili množstvo ľahkého a ťažkého reťazca nanosením na polyakrylamidový gél a následným blotom.

Ďalšou metódou testovania bol Western blot. Na rozdiel od metódy ELISA, pri príprave vzoriek na Western blot dochádza k denaturácii proteínov. Takto denaturovaný proteín nemusí viazať protilátku tak ako jeho natívna forma využívaná pri metóde ELISA. Tento denaturovaný proteín sa veľmi pravdepodobne líši v trojrozmernej štruktúre zloženia proteínu. Veľmi pravdepodobne sa môže líšiť i v jednotlivých krátkych úsekoch, na ktorý sa daná protilátka viaže. Rovnako môže byť detekovaná oblasť inak sformovaná, čo zapríčiniť, že

daná protilátka sa viaže s menšou afinitou a vďaka slabej väzbe na antigén sa neudrží na danou mieste. Tieto zmeny s najväčšou pravdepodobnosťou zapríčinili to, že pri detekcii na jednotlivých blotoch sme nič nedetkovali, pričom sérum antigén detkovalo úspešne. Takže sme nezachytili klon produkujúci protilátku proti denaturovanej forme CDK13.

Poslednou metódou je imunoprecipitácia, ktorá bola odskúšaná na jednotlivých sérach. Sérum bolo získané z myši a uchovávané v chladničke pri 4°C a jednotlivé vzorky boli odobrané zo samca myši týždeň pred imunoprecipitáciou. Ako môžeme vidieť vo výsledkoch a na Obrázok 34: Imunoprecipitácia vzorkami z Tabuľka 4: Vzorky na imunoprecipitáciu, sérum precipituje CDK13. Táto schopnosť séra precipitovať nám dáva možnosť odskúšania tejto metódy aj na jednotlivých hybridomoch. Jednotlivé narastené kolónie hybridomových kultúr boli zamrazené a ich testovanie na túto metódu bude v najbližšej dobe v nadväznosti na túto diplomovú prácu.

ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bola príprava monoklonálnych protilátok proti cyklin-dependetnej kináze 13 (CDK13). Túto protilátku sme chceli získať imunizovaním myši Balb/C antigénom CDK13 N- terminalným a C- terminálnym koncom. Ako sme zistili, C-terminálny koniec nemusí byť úplne biokompatibilný, keďže jeho produkcia v bunkách bola nízka a zároveň myš imunizovaná týmto antigénom umrela po druhej imunizačnej dávke. Pri ostatných myšiach imunizovaných N- terminálnym antigénom sa navonok žiadne zdravotné problémy neprejavili. Napriek tomu všetky imunizované myši boli použité pri fúzovaní buniek ako zdroj splenocytov.

Myši boli po 4. imunizačnej dávke usmrtené, splenocyty a myelomové bunky sfúzované a úspešne sa nám podarilo vytvoriť hybridomové bunky, ktoré v selekčnom HAT médiu preživali a boli schopné množenia. Tieto bunky boli následne pestované na 96-jamkovej doštičke. Po náraste ich koncentrácie boli bunky prepipetované do 12-jamkovej doštičky. Na týchto doštičkách úspešne rástli a ich supernatant bol testovaný na špecifických protilátok biochemických metódach Western blot a ELISA.

Testovaním pomocou metódy ELISA sme dokázali produkciu protilátok. Tieto protilátky produkovali niektoré sfúzované bunky v jamkách pre splenocyty získané z myši imunizovanej C-terminálnou tak i N-terminalnou doménou CDK13. Po úspešnej detekcii boli supernatanty z jamiek použité na metódu Western blot.

Metóda Western blot neukázala žiadne pozitívne výsledky, čo ukázalo, že tieto protilátky pôsobili s najväčšou pravdepodobnosťou len na natívnu formu antigénu, pričom pri príprave vzoriek dochádza k denaturácii antigénu.

Konečným parametrom bola imunoprecipitácia, kde sme dokázali, že sérum získané z myši vie precipitovať. Tieto precipitačné vlastnosti budeme následne v ďalších pokusoch overovať v našom laboratóriu aj na konkrétnych hybridomoch, keďže všetky narastené hybridomové kolónie boli zamrazené pre ďalšie testovanie.

SKRATKY

BSA – bovine serum albumin (hovädzí sérový albumín)

CDK – cyklin-dependetná kináza

ELISA – enzyme linked immunosorbent assay

HCl – kyselina chlorovodíková

HRP – horseradish peroxidase

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleonová kyselina

PEG – polyetylénglykol

PBS – Phosphate-Buffered Saline

RNA – ribonukleonová kyselina

RPM – revolutions per minute (otáčky za minútu)

SDS – sodium dodecyl sulfát

TMB – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin

WBC – white blood cell (biele krvinky)

OBRÁZKY

Obrázok 1:bunečný cyklus – restriction point – restričný bod, v tomto bode sa ukončuje bunečné delenie a bunka prechádza do kľudovej G0-fáze [13]	11
Obrázok 2:Štruktúra CDK13 a väzba na cyklin K [12]	12
Obrázok 3:Kostra imunoglobulínu a miesta pôsobenia papaínu [10]	12
Obrázok 4: Väzba protilátky na antigén [10]	13
Obrázok 5: Modely epitopov[10]	13
Obrázok 6:PAGE-SDS gél počas elektroforézy.....	15
Obrázok 7: Rozptyl svetla prechodom cez bunku [19]	15
Obrázok 8:Aparatúra na western blot.....	18
Obrázok 9:Sonifikácia buniek.....	20
Obrázok 10:Kolona na separáciu proteínu	21
Obrázok 11:Peristaltická pumpa – separácia proteínu	22
Obrázok 12: Odfarbovanie gélov	24
Obrázok 13:N-terminálna doména - expresia	28
Obrázok 14:N-terminálna doména po prečistení	28
Obrázok 15:C-terminálna doména - expresia.....	28
Obrázok 16:C-terminálna doména po prečistení.....	29
Obrázok 17: Kalibračná krivka koncentrácie BSA	29
Obrázok 18: Kalibračná krivka koncentrácie BSA	31
Obrázok 19: kontrola produkcie protilátky myši C1 (1:500)- expozícia (1 minúta)	32
Obrázok 20: kontrola produkcie protilátky myši C2 (1:500)- expozícia (1 minúta)	32
Obrázok 21: kontrola produkcie protilátky myši N1 (1:500)- expozícia (1 minúta)	32
Obrázok 22: kontrola produkcie protilátky myši N2 (1:500)- expozícia (1 minúta)	33
Obrázok 23: kontrola produkcie protilátky myši N3 – A) 1:500, B) 1:1000 - expozícia (1 minúta)	33
Obrázok 24: množstvá splenocytov (WBC) merané prietokovým cytometrom	35
Obrázok 26: A)test séra N myši(1:500), B) test séra N myši (1:1000), C))test séra C myši (1:1000) – expozícia (1 minúta).....	36
Obrázok 27: A)test séra N myši(1:500), B) test séra N myši (1:1000), C))test séra C myši (1:1000) – expozícia (5 minút).....	36
Obrázok 28: A)test séra N myši(1:500), B) test séra N myši (1:1000), C))test séra C myši (1:1000) – expozícia (20 minút).....	37
Obrázok 29: ELISA - kontrola produkcie protilátok	37
Obrázok 30: test hybridomu H1 – expozícia 1 minúta.....	39
Obrázok 31b: test hybridomu H1 – expozícia 40 minút	39
Obrázok 32: test hybridomov – expozícia 5minút	39
Obrázok 33: test hybridomov – expozícia 35 minút	40
Obrázok 34: test hybridomov – expozícia 1 minúta	40
Obrázok 35: Imunoprecipitácia vzorkami z tabuľky 4.....	40

TABULKY

Tabuľka 1: Harmonogram imunizácie	22
Tabuľka 2: Príprava PAGE-SDS gélu.....	23
Tabuľka 3:Príprava zaostrovacieho gélu.....	23
Tabuľka 4: Vzorky na imunoprecipitáciu	27
Tabuľka 5:Absorbancia pre rôzne koncentrácie BSA.....	29
Tabuľka 6: Absorbancia pre vzorky antigénu C a N.....	30
Tabuľka 7: Absorbancia pre vzorky antigénu C a N.....	31
Tabuľka 8:Absorbancia pre vzorky antigénu C a N.....	31
Tabuľka 9:Množstvá antigénu využité na imunizáciu	32
Tabuľka 10: množstvá buniek sp-2 a splenocytov použitých na myš 1 – antigén C	33
Tabuľka 11:: množstvá buniek sp-2 a splenocytov použitých na myš 2 – antigén C	34
Tabuľka 12: množstvá buniek sp-2 a splenocytov použitých na myš 1 – antigén N	34
Tabuľka 13: množstvá buniek sp-2 a splenocytov použitých na myš 2 – antigén N	34
Tabuľka 14: Výsledky metódy ELISA na vzorkách supernatantov odobraných z hybridomových buniek.....	38
Tabuľka 15: Vzorkov dávajúce pozitívny signál metódov ELISA	38

ZDROJE

- [1] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902-9060-4.
- [2] KOHOUTEK, Jiri a Dalibor BLÁZEK. Cyclin K goes with Cdk12 and Cdk13. *Cell Division*. 2012, **7**(12), 10. DOI: 10.1186/1747-1028-7-12.
- [3] NELSON, DAVID L. a MICHAEL M. COX. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3. University of Wisconsin-Madison: WORTH PUBLISHERS, 2000. ISBN 1-57259-931-6.
- [4] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [5] HUNTER, T. a H. TOYOSHIMA. P27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell Press*. 1994, , 67-74. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90573-8.
- [6] Sandeep Robert. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*. 1997, **91**. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80405-5. ISSN 00928674.
- [7] NISHIZUKA, Yasutomi. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*. 1984, **308**(5961), 693-698. DOI: 10.1038/308693a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/308693a0>
- [8] MANNING, G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*. 1984, **298**(5600), 1912-1934. DOI: 10.1126/science.1075762. ISSN 00368075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1075762>
- [9] ZHANG, Tinghu, Nicholas KWIATKOWSKI, Calla M OLSON, et al. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Nature Chemical Biology*. 2016, **12**(10), 1912-1934. DOI: 10.1038/nchembio.2166. ISSN 1552-4450. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1075762>
- [10] BUC, Milan. *ZÁKLADNÁ A KLINICKÁ IMUNOLÓGIA*. 1. Bratislava: SAV, 2012. ISBN 978-80-224-1235-3.
- [11] MARQUÉS, Francois, Jean-Luc MOREAU, Gerard PEAUCELLIER, Jean-Claude LOZANO, Philippe SCHATT a PICARD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000, **279**(3). DOI: 10.1006/bbrc.2000.4042. ISSN 0006291X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X00940427>
- [12] GREIFENBERG, Ann Katrin, Dana HÖNIG, Kveta PILAROVA, et al. A New Subfamily of High Molecular Mass CDC2-Related Kinases with PITAI/VRE Motifs. *Cell Reports*. 2016, **14**(2), 832-837. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.025. ISSN 22111247. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X00940427>
- [13] COOPER, Geoffrey M. *The Cell : A Molecular Approach 2nd*. 2. American Society of Microbiology, 2000. ISBN 978-0-87893-106-4.

- [13] GRANT, Marianne K. O., Samantha L. SHAPIRO, Karen H. ASHE, Peng LIU a Kathleen R. ZAHES. A Cautionary Tale: Endogenous Biotinylated Proteins and Exogenously-Introduced Protein A Cause Antibody-Independent Artefacts in Western Blot Studies of Brain-Derived Proteins. *Biological Procedures Online* [online]. 2019, **21**(1) [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1186/s12575-019-0095-z. ISSN 1480-9222. Dostupné z: <https://biologicalproceduresonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12575-019-0095-z>
- [14] BURNETTE, W.Neal. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* [online]. 1981, **112**(2), 195-203 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90281-5. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269781902815>
- [15] "What is Flow Cytometry?," News-Medical.net, 11-May-2010. [Online]. Available: <http://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Flow-Cytometry.aspx>. [Accessed: 21-Feb-2017]. [14] "Evolution Flow: T
- [16] PARK, Min-Seung, In Young YOO, Hee Jin KIM, Sun-Hee KIM, Seok Jin KIM a Duck CHO. Flow Cytometric Analysis of T Cells in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Annals of Laboratory Medicine*. 2019, **39**(5). DOI: 10.3343/alm.2019.39.5.430. ISSN 2234-3806. Dostupné také z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3343/alm.2019.39.5.430>
- [17] ZUK, Patricia A., Min ZHU, Hiroshi MIZUNO, et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*. 2001, **7**(2), 211-228. DOI: 10.1089/107632701300062859. ISSN 1076-3279. Dostupné také z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107632701300062859>
- [18] DARZYNKIEWICZ, Z., S. BRUNO, G. DEL BINO, W. GORCZYCA, M. A. HOTZ, P. LASSOTA a F. TRAGANOS. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 1992, **13**(8), 795-808. DOI: 10.1002/cyto.990130802. ISSN 0196-4763. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.990130802>
- [19] "Flow cytometry guide | Abcam." [Online]. Available: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>.
- [20] ENGVALL, Eva a Peter PERLMANN. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971, **8**(9), 871-874. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-X. ISSN 00192791. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001927917190454X>